

**Untersuchung von Signalkomponenten der
sexuellen Entwicklung bei dem
Basidiomyceten *Schizophyllum commune***

Dissertation

**zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)**

**vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Diplombiologin Nicole Knabe
geboren am 21.09.1975 in Apolda**

Gutachter:

1. Prof. Dr. Erika Kothe (Jena)
2. Prof. Dr. Axel A. Brakhage (Jena)
3. Prof. Dr. Reinhard Fischer (Karlsruhe)

Tag der öffentlichen Disputation: 14.07.2008

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungsverzeichnis	
1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	3
2.1 <i>Schizophyllum commune</i> als Modellorganismus	3
2.2 Die Rolle von Ras-Proteinen in Signaltransduktionskaskaden von Pilzen	7
2.3 Proteinkinase A	14
2.4 Ziele der Arbeit	17
3. Material	19
3.1 Chemikalien und Enzyme	19
3.2 Lösungen und Medien	19
3.3 Oligonukleotide	23
3.4 Plasmide und Organismen	24
4. Methoden	27
4.1 Arbeiten mit <i>Escherichia coli</i>	27
4.1.1 Anzucht	27
4.1.2 Präparation von Plasmid-DNA	27
4.1.3 Transformation von <i>E. coli</i> mittels Elektroporation	28
4.2 Arbeiten mit <i>Schizophyllum commune</i>	28
4.2.1 Anzucht	28
4.2.2 Präparation genomischer DNA	29
4.2.2.1 CTAB-Methode	29
4.2.2.2 Schnellisolierung genomischer DNA	29
4.2.2.3 Messung der Nukleinsäure-Konzentration	30
4.2.3 Präparation Gesamt-RNA	30
4.2.4 Isolierung von Proteinen zur Bestimmung der Proteinkinase A-Aktivität	31
4.2.5 Transformation von <i>S. commune</i>	31
4.2.6 Intrazelluläre cAMP Messung in <i>S. commune</i>	32
4.2.7 Bestimmung der Proteinase A-Aktivität	33
4.2.8 Indirekte Immunfluoreszenz-Färbung	33
4.2.9 Anfertigung von Mikrotomschnitten verschiedener Fruchtkörperstadien von <i>S. commune</i>	34
4.3 Weitere molekularbiologische Arbeiten	35
4.3.1 Restriktion von DNA	35
4.3.2 Agarose-Gelelektrophorese	35
4.3.3 Klonierung von DNA-Fragmenten	36
4.3.4 DNA-Sequenzierung	36
4.3.5 Polymerasekettenreaktion	36
4.3.5.1 Amplifizierung von DNA	36
4.3.5.2 TAIL-PCR	37
4.3.5.3 Fusions-PCR	37
4.3.5.4 Quantitative Real-Time PCR	38
4.3.6 DNA-Hybridisierung	38
4.3.6.1 Herstellung markierter DNA-Sonden	38
4.3.6.2 Southern-Hybridisierung	39

Inhaltsverzeichnis

4.3.6.3	Kolonie-Hybridisierung	39
4.3.7	<i>In vitro</i> Mutagenese mittels PCR	40
5.	Ergebnisse	41
5.1.	Untersuchung von <i>ras1</i> aus <i>S. commune</i>	41
5.1.1	Isolierung und Charakterisierung von <i>ras1</i> aus <i>S. commune</i>	41
5.1.2	Kopienzahl und Suche nach möglichen orthologen Genen	46
5.2.	Erzeugung von Ras1-Mutanten in <i>S. commune</i>	47
5.2.1	Homologer Promotor	47
5.2.2	Induzierbarer Promotor	49
5.3.	Charakterisierung der konstitutiv aktiven Mutanten	50
5.3.1	Erzeugung der konstitutiv aktiven Mutanten II-1 ^{Q61L} , T2 ^{G12V} , II-1 ^{G12V} und CellT62 ^{G12V}	50
5.3.2	Kopienzahl und Genexpression	51
5.3.3	Wachstumsrate	53
5.3.4	Unpolares Wachstum	55
5.3.5	Vermehrte Seitenzweigbildung	58
5.3.6	Kreuzungen	59
5.4.	Intrazelluläre cAMP-Messung und Proteinkinase A-Test	62
5.4.1	Intrazellulärer cAMP-Gehalt	62
5.4.2	Aktivitätsbestimmung der PKA	63
5.5.	Identifizierung von <i>tpk</i> aus <i>S. commune</i>	65
5.5.1	Isolierung und Charakterisierung von <i>tpk</i> aus <i>S. commune</i>	65
5.5.2	Nachweis von Homologen zu <i>tpk</i> im Genom von <i>S. commune</i>	69
5.1.3	Untersuchung der Expression von <i>tpk</i>	70
6.	Diskussion	72
6.1	Die chromosomale Struktur von <i>ras1</i>	72
6.2	Funktion von Ras1 in <i>S. commune</i>	75
6.2.1	Expressionsuntersuchungen	76
6.2.2	Wachstumsrate	77
6.2.3	Zytoskelett	78
6.2.4	Einfluss von Ras1 auf das Kreuzungsverhalten	84
6.2.5	Beeinflussung der Fruchtkörperentwicklung	85
6.2.6	Ras1 und cAMP / PKA-Signaltransduktion	88
6.3	Die chromosomale Struktur von <i>tpk</i>	90
6.4	Aktivitätsbestimmung von <i>tpk</i>	93
6.5	Ausblick	94
7.	Literaturverzeichnis	96
Selbständigkeitserklärung		
Danksagung		
Lebenslauf		

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
<i>Aqua dest.</i>	destiliertes H ₂ O
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin („bovine serum albumine“)
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	complementary desoxyribonucleic acid ("komplementäre Desoxyribonukleinsäure")
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
Δ	Deletion
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
<i>et al.</i>	und andere
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
M	Molar
MES	2-(N-morpholino)-ethansulfonsäure
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen ("open reading frame")
PCR	Polymerasekettenreaktion („polymerase chain reaction“)
PEG	Polyethylenglykol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PKA	Proteinkinase A
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute ("Umdrehung pro Minute")
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	sodium chloride/sodium citrate
Tab.	Tabelle
TAE	TrisAcetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
U	Unit = μmol Umsatz pro Minute
ÜN	über Nacht
Vol	Volumen
WT	Wildtyp

1. Zusammenfassung

Der Homobasidiomycet *Schizophyllum commune* Fr., der Gemeine Spaltblättling, ist ein weltweit verbreiteter Weißfäuleerreger, der vorzugsweise auf abgestorbenen Laubholz vorkommt. Die Verwendung als genetisches Untersuchungsobjekt verdankt der Pilz der Fähigkeit, den gesamten Lebenszyklus auf definierten Medien im Labor innerhalb von zwei Wochen zu durchlaufen.

GTP-bindende Proteine der hochkonservierten Ras-Familie agieren als Molekularer Schalter, die in einem aktiven, GTP-gebundenen Zustand, oder einem inaktiven, GDP-gebundenem Zustand in der Zelle vorliegen können. Die Aktivität von Ras wird durch zwei Arten von Proteinen kontrolliert. Die GTPase aktivierenden Proteine (GAPs) beschleunigen die Hydrolyse des GTPs zu GDP, was zu einer Inaktivierung von Ras führt. Im Gegensatz dazu erleichtern die Guaninnukleotidaustauschfaktoren (GEFs) den Austausch des gebundenen GDPs mit GTP, indem sie die Dissoziationsrate des GDPs erhöhen. Ras-Proteine sind als Regulatoren einer Vielzahl von zellulären Prozessen bekannt, wie Zellmorphologie, Interaktion mit Kreuzungspartnern, Reaktion auf Stress und Zellpolarität.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Ras1 und Gap1 des Homobasidiomyceten *S. commune* an der sexuellen Entwicklung des Pilzes beteiligt sind. Konstitutiv aktive Ras1- und Δ gap1-Mutanten zeigten ein verändertes Verhalten im polaren Wachstum des Pilzmyzels auf Festmedien. Während die Hyphen der Wildtyp-Stämme ihre geradlinige Wachstumsrichtung beibehielten, veränderten die Hyphen der Mutanten-Stämme ihre Wachstumsrichtung und erschienen kurvig. Bei konstitutiv aktiven Ras1-Stämmen konnte man zusätzlich die Ausbildung vermehrter Seitenzweige beobachten. Kompatible konstitutiv aktive Ras1-Mutanten waren nicht in der Lage, ein Dikaryon auszubilden, d.h. sich sexuell zu vermehren. Kreuzungen konstitutiv aktiver Ras1-Mutanten mit kompatiblen Wildtypstämmen führte zur Ausbildung von Fruchtkörpern und Sporen, die aber eine verringerte Keimungsrate gegenüber dem Wildtyp zeigten. Homozygote Δ gap1/ Δ gap1-Kreuzungen waren in der Lage Fruchtkörper auszubilden, die aber einen Defekt in der Ausbildung des Hymeniums mit fehlender Sporenbildung aufwiesen. Untersuchungen der cAMP-abhängigen Proteinkinase A hat gezeigt, dass konstitutiv aktive Ras1- und Δ gap1-Mutanten eine deutliche Zunahme ihrer PKA-Aktivität aufwiesen. Dies deutet auf eine Ras1/cAMP vermittelte Signaltransduktionskaskade in *S. commune* hin. Desweiteren wurde das Gen *tpk*, die katalytische Untereinheit der PKA, aus dieser Signalkaskade isoliert und charakterisiert.

summary

The common split-gill, *Schizophyllum commune*, is a saprophytic white rot fungus. *S. commune* has a life cycle that can be completed on artificial media in the laboratory within two weeks. It has independently reproducible haploid and dikaryotic phases.

Ras is a member of a highly conserved family of membrane-bound guanine nucleotide binding proteins. The ability to bind and hydrolyze GTP allows Ras proteins to exist either in an active, GTP-bound form or an inactive, GDP-bound form. Guanine nucleotide exchange factors (GEFs) promote the formation of the active GTP-bound form of Ras. GTPase activating proteins (GAPs) accelerate the intrinsic GTP hydrolytic activity of Ras to promote the formation of the inactive, GDP-bound form of Ras. Ras proteins are regulators of different cellular processes such as cell morphology, mating, response to stress, and cell polarity.

Here, it is shown that Ras1 and Gap1 are involved in sexual development of the homobasidiomycete *S. commune*. Microscopic examinations showed that constitutive active Ras1 and $\Delta gap1$ strains exhibited a disorientated growth pattern. The mutants are unable to maintain growth direction on solid media. While hyphae of wildtype strains grew straight keeping their growth axis, hyphae of the mutants grew in a curved manner, changing their orientation during growth. The hyphae of the Ras1 mutants also showed a hyperbranching effect. Compatible Ras1 mutant strains are unable to form dikaryons, but the mating of Ras1 mutant strains with compatible wildtype strains generates normal fruiting bodies. The spores showed a reduced germination rate in comparison to the wildtype. Homozygote $\Delta gap1/\Delta gap1$ dikaryons produce abnormal fruit bodies with abnormal gills and without spore production.

Investigation of the cAMP-dependent protein kinase A showed that constitutive active Ras1 and $\Delta gap1$ mutant strains exhibit a strong increase of the activity of the PKA. This points at a Ras1/cAMP mediated signal transduction pathway in *S. commune*. A second gene of the cAMP signal transduction pathway, the catalytic subunit of the PKA (*tpk*) was isolated and characterized.

2. Einleitung

2.1 *Schizophyllum commune* als Modellorganismus

Der filamentöse Pilz *Schizophyllum commune* Fr. (Gemeiner Spaltblättling) ist ein Homobasidiomycet aus der Ordnung der Aphyllophorales. Der weltweit vorkommende Weißfäuleerreger, der vorwiegend auf abgestorbenen Holz vorkommt, besitzt 2-3 cm große, muschelförmige Fruchtkörper mit längsgespaltenen Lamellen (Abb. 2.1).



Abb. 2.1: Fruchtkörper des Gemeinen Spaltblättlings *Schizophyllum commune*

Der heterothallische Pilz kann unter Laborbedingungen innerhalb von zwei Wochen einen vollständigen Generationswechsel durchlaufen und lässt sich in monokaryotischer und dikaryotischer Form kultivieren. Voraussetzung für die Ausbildung von Fruchtkörpern ist ein Dikaryon. Nach Fusion zweier monokaryotischer Hyphen bildet sich ein dikaryotisches Myzel, wobei jede Zelle zwei haploide Kerne besitzt. Die Fusion zweier Monokaryen ist unabhängig vom Kreuzungstyp der Fusionspartner (Raper, 1966). Alle weiteren sexuellen Entwicklungsprozesse werden dagegen von den Kreuzungstypen beeinflusst. Nach Induktion durch bestimmte Umweltsignale, wie Licht und ein niedriger CO₂-Gehalt der Luft (Niederpruem, 1963; Ruiters *et al.*, 1988; Sietsma *et al.*, 1977), entwickeln sich die charakteristischen Fruchtkörper (Raudaskoski & Viitanen, 1982; Yli-Mattila *et al.*, 1989). In den sich dort entwickelnden Basidien findet die Karyogamie statt (Radu *et al.*, 1974). Nach erfolgter Meiose werden von jeder Basidie vier haploide Basidiosporen abgeschnürt, die nach der Verbreitung wieder zu Monokaryen auskeimen (Abb. 2.2).

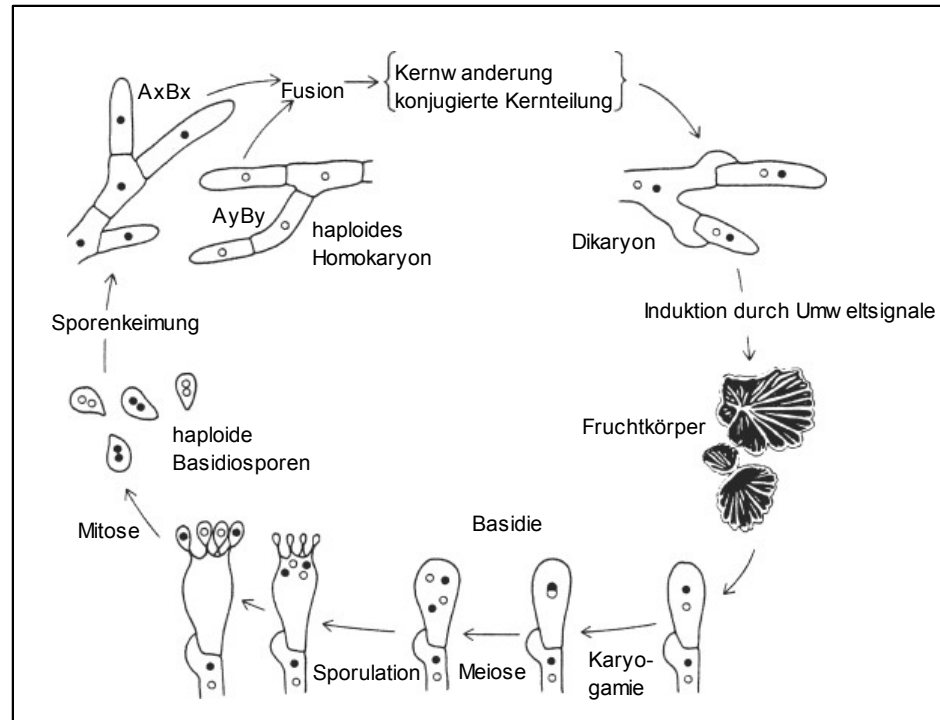


Abb. 2.2: Lebenszyklus von *S. commune*

Weiß und schwarze Kreise stellen unterschiedliche haploide Kerne dar. *A* und *B* sind die Kreuzungstypen und *x* und *y* stehen für die Spezifität jedes Faktors.

Schon 1920 wurde durch Kreuzungsversuche erkannt, dass nur 25 % aller aus Sporen eines Fruchtkörpers isolierten Myzelien bei einer Rückkreuzung mit einem der Eltern wieder Fruchtkörper bilden konnten (Knip, 1920 und 1922). Knip schloss daraus, dass zwei unabhängige Erbfaktoren, *A* und *B* genannt, für die Festlegung des Kreuzungstyps verantwortlich sind. Da zwischen zwei haploiden Stämmen vier Interaktionstypen möglich sind, spricht man in diesem Zusammenhang auch von einem tetrapolaren Kreuzungssystem. Durch Rekombinationsanalyse konnte später gezeigt werden, dass sich sowohl *A* als auch *B* aus zwei gekoppelten Genorten, jeweils α und β genannt, zusammensetzen (Raper *et al.*, 1958; Raper *et al.*, 1960; Koltin *et al.*, 1967; Stamber und Koltin, 1974). Die Genorte $A\alpha$, $B\alpha$ und $B\beta$ liegen in jeweils neun Spezifitäten vor und der Genort $A\beta$ sogar in 32 (Koltin *et al.*, 1972). Insgesamt ergibt sich damit eine theoretisch mögliche Anzahl von 23.328 verschiedenen Kreuzungstypen. Für eine voll kompatible Interaktion, die zur Ausbildung des Dikaryons führt, reichen unterschiedliche Spezifitäten in jeweils einem der beiden Subloci aus.

Nur wenn die Kreuzungspartner in beiden Genorten *A* und *B* unterschiedlich sind ($A \neq B$) wird ein voll kompatibles Dikaryon ausgebildet, welches in der Lage ist Fruchtkörper zu bilden. Durch die Ausbildung von Schnallen wird die gleichmäßige Verteilung der Kerne während der Zellteilung von der wachsenden Spitzenzelle auf die dahinterliegende Mutterzelle gewährleistet (Koltin und Raper, 1968; Niederpruem *et al.*, 1971; Casselton, 1978).

Die Etablierung des Dikaryons wird durch beide Kreuzungstypfaktoren *A* und *B* gesteuert. Nach der Verschmelzung von zwei kompatiblen Myzelien kommt es zum reziproken Austausch von Zellkernen der Partner durch Kernwanderung. Dieser Prozess unterliegt der Kontrolle des *B*-Faktors (Raper, 1966). Die Ausbildung von Schnallenzellen und die Kernverteilung wird durch den *A*-Faktor kontrolliert. Der letzte Schritt, die Verschmelzung der Schnalle mit der subapikalen Zelle wird wiederum vom *B*-Faktor reguliert.

Das ersten Stadium der Fruchtkörperentwicklung umfasst die Aggregation und das aufwärtsgerichtete Wachstum des Lyftmyzels, worauf es zur Ausbildung der „hyphal knots“ kommt. Es findet gerichtetes Wachstum auf das apikale Zentrum der sich entwickelnden Primordien statt. Im Zentrum sind die Hyphen relativ kurz, verglichen mit den wesentlich längeren apikalen Zellen in der Peripherie. Während der zunehmenden Verlängerung des Primordiums kommt es zu einem schnellen aufwärts- und wieder abwärtsgerichteten Wachstums der unverzweigten, peripheren Hyphen (Abb. 2.3 A).

Das Hymenium bildet sich am Boden des entstehenden Hohlraums der sich durch laterales Wachstum vergrößert (Abb. 2.3 B). Durch Wachstum von Hyphen aus dem Subhymenium, kommt es zur Ausbildung der charakteristischen längsgespaltenen Lamellen (Abb. 2.3 C, E, F). Basidien bilden sich im Hymenium an den apikalen Enden sich verzweigender, kurzer Hyphen. An der Basidie bilden sich vier Basidiosporen (Abb. 2.3 D), die über ein Sterigmata mit der Basidie verbunden sind (Essig, 1922; Volz und Niederpruem, 1969; van der Valk und Marchant, 1978).

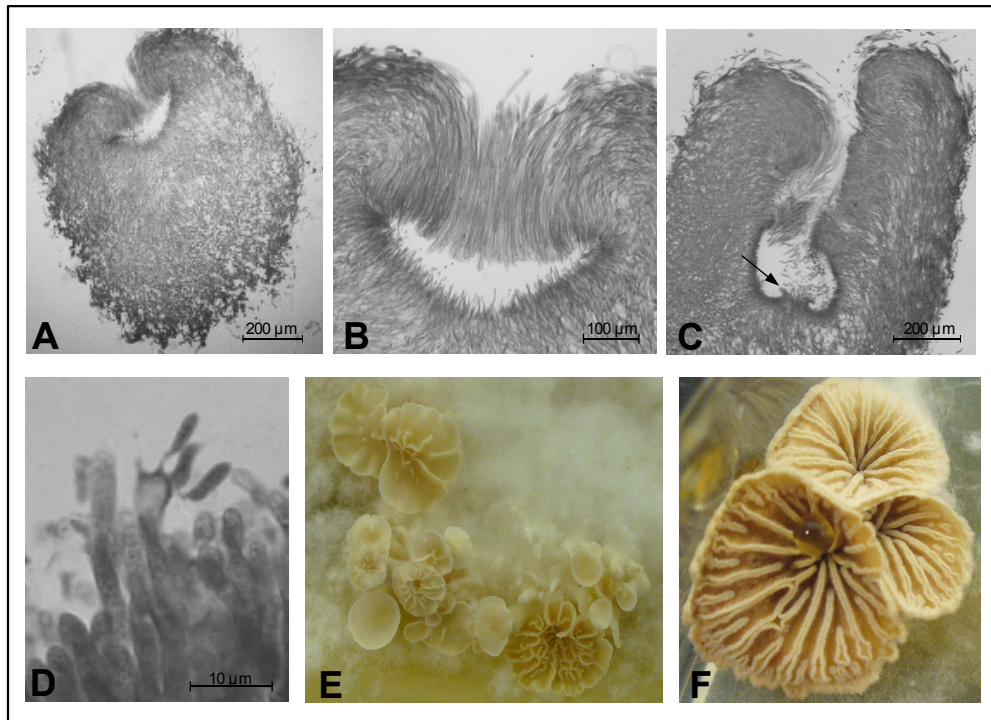


Abb. 2.3: Fruchtkörperentwicklung von *S. commune*

A) Querschnitt eines Primordiums. B) Hymenium am Boden einer sich bildenden Höhle im Primordium. C) Lamellenbildung durch Ausfaltungen des Hymeniums (Pfeil). D) Basidiosporen an einer Basidie. E) Beginnende Ausbildung der Lamellen. F) Fruchtkörper mit charakteristischen längsgespaltene Lamellen. (Fotos A-D: Matthias Gube, Universität Jena)

Neben der kompatiblen Kreuzung ($A \neq B \neq$) gibt es die inkompatible Kreuzung ($A = B =$), sowie zwei semikompatible Kreuzungen ($A \neq B =$, $A = B \neq$). Eine Kreuzung von semikompatiblen Stämmen führt nicht zum dikaryotischen Zustand. Unterscheiden sich die Stämme nur im *A*-Genort ($A \neq B =$), so findet eine Wechselwirkung der Myzelien nur im Kontaktbereich statt. Da sie wieder auseinanderwachsen, erhält man eine Zone reprimierten Wachstums („Barrage“-Reaktion). Die Myzelien bilden nicht fusionierte Schnallen, sogenannte Pseudoschnallen (Niederpruem *et al.*, 1971).

Kreuzungen bei denen sich die Partner nur im *B*-Faktor unterscheiden ($A = B \neq$) zeigen eine verringerte Bildung von Luftmyzel. Dieser Phänotyp wird als „flat“ bezeichnet. Die Hyphen sind stark deformiert und weisen viele kurze Verzweigungen auf. Die Kernverteilung innerhalb des Myzels ist unregelmäßig. Die Anzahl der Kerne schwankt zwischen null und 20 (Koltin und Flexer, 1969; Niederpruem 1980).

Der Faktor *A* kodiert für Transkriptionsfaktoren des Homöodomänentyps (Specht *et al.*, 1992). Solche Proteine sind Regulatoren der Genexpression, die an spezifische Sequenzen der DNA binden. Der *B*-Genort von *S. commune* kodiert jeweils für einen Pheromonrezeptor und mehrere Pheromone (Wendland *et al.*, 1995; Specht 1995; Vaillancourt *et al.*, 1997). Die von *B* kodierten Rezeptoren gehören zur Familie der G-Protein gekoppelten sieben Transmembrandomänen-Rezeptoren. Die Bindung eines Pheromons eigener Spezifität an den Rezeptor führt zu keiner Signaltransduktion. Die Bindung eines Pheromons einer anderen Spezifität, führt zur Konformationsänderung des Rezeptors und somit zur Aktivierung eines heterotrimeren G-Proteins und damit zur Induzierung einer Signalkaskade in der Zelle (Kothe, 1996).

Die Erkennung verschiedener Umweltsignalen spielt eine wichtige Rolle für alle eukaryontischen Organismen. Signale werden an der Zelloberfläche wahrgenommen, mittels transmembraner Rezeptormoleküle übertragen und durch intrazelluläre Signalwege weitergeleitet. Sie können somit komplexe zelluläre Veränderungen koordinieren, wie Metabolismus, Genexpression, Zellteilung und Zellmorphologie. Zur Signaltransduktionskaskade in *S. commune* ist bis jetzt nur wenig bekannt. Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Funktion zweier Gene, *ras1* und *tpk*, die an der Umsetzung von Signalen in der sexuellen Entwicklung von *S. commune* beteiligt sind.

2.2 Die Rolle von Ras-Proteinen in Signaltransduktionskaskaden von Pilzen

Bei der Suche nach kreuzungstypspezifisch exprimierten Genen konnte ein Gen für ein Ras GTPase aktivierendes Protein (GAP), *gap1*, isoliert und charakterisiert werden (Schubert *et al.*, 2000; Schubert *et al.*, 2006). Das Ras-Protein wird seit den sechziger Jahren des 20. Jahrhunderts untersucht. Durch Beobachtungen bei Ratten ist bekannt, dass die krebsauslösende Wirkung zweier Viren jeweils durch ein spezielles Gen hervorgerufen wird (Harvey, 1964). Die Genprodukte wurden als Ras bezeichnet, als Akronym für Ratten-Sarkom. In weiteren Untersuchungen stellte man fest, dass die *ras*-Gene nicht viralen Ursprungs waren, sondern aus dem Genom der Ratte selbst stammten. In Säugetieren führt die Mutation des *ras*-Gens zur Erzeugung von Krebs (Bos, 1989). Später entdeckte man, dass Ras in praktisch allen eukaryotischen Zellen vorkommt. Nur in Pflanzen konnte das Gen bisher nicht nachgewiesen werden. Dort liegt eine veränderte Genfamilie vor.

Ras ist Mitglied der konservierten Superfamilie von membrangebundenen G-Proteinen. G-Proteine wie Ras funktionieren als molekulare Schalter, die in einem aktiven GTP-gebundenen Zustand oder einem inaktiven GDP gebundenem Zustand in der Zelle vorliegen können (Abb 2.4). Die Aktivität von Ras wird durch zwei Proteine kontrolliert. Die Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) erleichtern den Austausch des gebundenen GDP mit GTP, was zu einer Aktivierung des Ras-Proteins führt. Die GTPase-aktivierenden Proteine (GAPs) beschleunigen die Hydrolyse des GTP zu GDP, die zu einer inaktiven Form des Ras-Proteins führen. Die Bindung von GTP an Ras erlaubt die Interaktion mit Effektorproteinen (Lowy, 1993). Untersuchungen an verschiedenen Pilzen haben gezeigt, dass Ras in unterschiedlichen Signaltransduktionskaskaden wirksam ist. Es wurden Interaktionen mit der Adenylatzyklase (Erzeugung von cAMP als intrazellulärer „second messenger“), Cdc42 (einem weiteren G-Protein) und einer MAP-Kinase-Kaskade nachgewiesen.

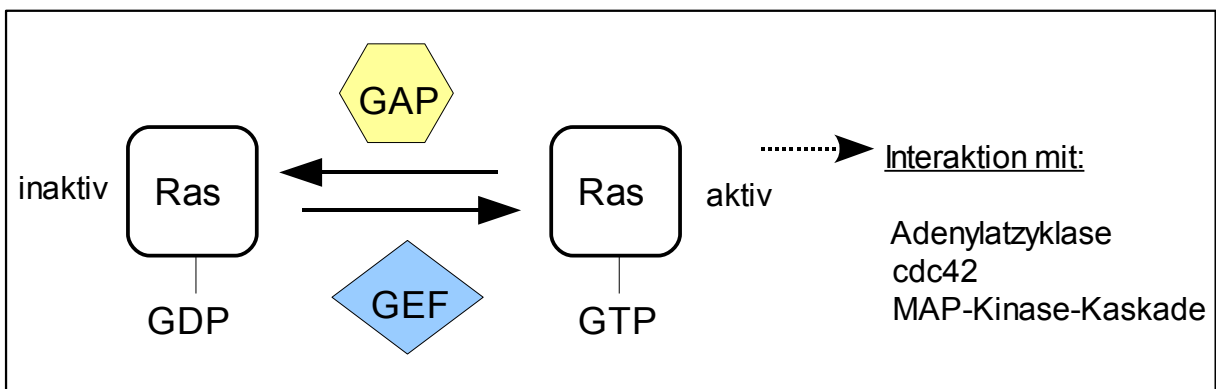


Abb. 2.4: Ras- Zyklus

Mutanten, denen ein GAP fehlt bzw. deren GAP inaktiv ist, zeichnen sich durch erhöhte oder konstitutive Aktivität des Ras Proteins aus. Die Untersuchung einer solchen Mutante in *S. commune* führte zu pleiotropen Effekten (Schubert *et al.*, 2006). *S. commune* $\Delta gap1$ -Mutanten zeigten ein vermindertes Wachstum auf Festmedien und ein desorientiertes polares Hyphenwachstum. Dikaryen wiesen eine Veränderung in ihrer Schnallenbildung und eine gestörte Fruchtkörperentwicklung auf. Der Signaltransduktionsweg für Ras1 in *S. commune* ist allerdings bisher noch nicht bekannt.

In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wurden zwei Gene gefunden, die jeweils für ein Ras-Protein kodieren (Kataoka *et al.*, 1984). Beide Ras-Proteine besitzen überlappende Funktionen, wobei Ras2 stärker exprimiert wird als Ras1. Unter Stickstoffmangelbedingungen im umgebenden Milieu bzw. bei Vorhandensein fermentierbarer Kohlenstoffquellen kann Ras2 zwei verschiedene Signalwege aktivieren (Abb. 2.5) und ermöglicht das filamentöse Wachstum diploider Hefezellen (Mösch *et al.*, 1999). Die Aktivierung von Ras2 führt durch die Aktivierung der Adenylatzyklase (Cyr1) zu einer Erhöhung des cAMP-Spiegels in der Zelle und somit zur Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) (Toda *et al.*, 1985). Es kommt dadurch zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors Flo8, der wiederum das Zelloberflächenprotein Flo11 aktivieren kann. Parallel kann Ras2 durch Aktivierung des Rho-Proteins Cdc42 eine MAP-Kinase-Kaskade aktivieren (Mösch *et al.*, 1996). Durch die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren Ste12 und Tec1 wird ebenfalls das Zelloberflächenprotein Flo11 aktiviert, das für die Zelladhäsion, Agarinvasion und Pseudohyphenwachstum benötigt wird. Es erfolgt also ein Zusammenwirken beider Signalwege durch die Aktivierung von Flo11 (Lengeler *et al.*, 2000).

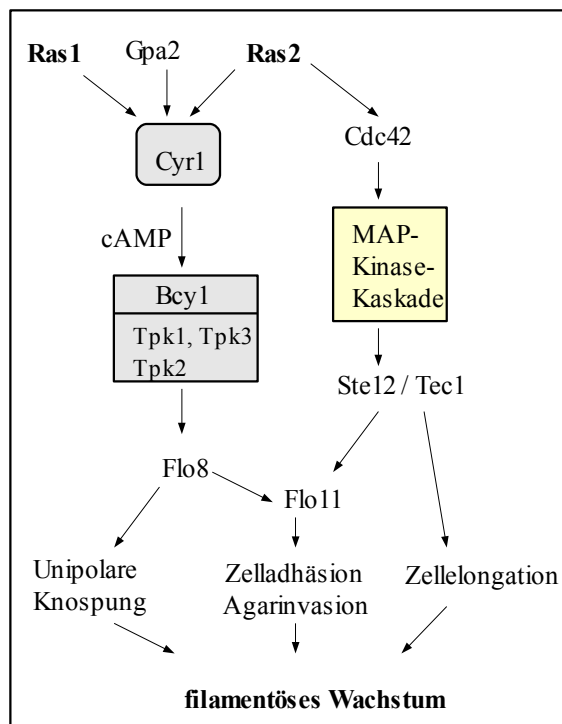


Abb. 2.5: Ras-Signaltransduktion bei *Saccharomyces cerevisiae*

Ras2 kann das filamentöse Wachstum der Hefe *S. cerevisiae* über zwei Signalwege steuern. Die Aktivierung des cAMP-Weges erfolgt durch Ras1, Ras2 und Gpa2. Über Ras2 und Cdc42 wird eine MAP-Kinase-Kaskade aktiviert.

Es wurde ebenfalls gezeigt, dass Ras an der Aufrechterhaltung des Zytoskeletts beteiligt ist (Ho und Bretscher, 2001). Die Deletion von *RAS2* führt zu einer Sensitivität gegen Hitzeschock und zu einer Depolarisierung des Aktin-Zytoskeletts. Die Deletion von *RAS1* oder *RAS2* ist im Gegensatz zum Doppel-Knockout nicht letal. Eine konstitutiv aktive Ras2-Mutante weist eine geringere Sporulation gegenüber dem Wildtyp auf und die Zellen sind unfähig zu knospen. Die Aktivität von Ras2 wird durch das GEF Cdc25 (Lai *et al.*, 1993; Rudoni *et al.*, 2001) und die GAPs Ira1 und Ira2 (Tanaka *et al.*, 1989, 1990 und 1991) reguliert. Ras1 von *S. cerevisiae* wirkt nur auf den cAMP/PKA-Weg (Lengeler *et al.*, 2000).

Die Spaltheife *Schizosaccharomyces pombe* besitzt ein Ras-Homolog (Fukui *et al.*, 1986), welches neben der Pheromonantwort und Sporulation auch die Morphogenese reguliert. Ras1 aktiviert zusammen mit Gpa1, einer α -Untereinheit eines heterotrimeren G-Proteins, eine MAP-Kinase-Kaskade und reguliert die sexuelle Erkennung und die Fusion zweier kompatibler Zellen (Abb. 2.6). Ras1 reguliert in einem zweiten Signalweg über Scd1, ein GEF für das Rho-Protein Cdc42 und durch die Aktivierung von Shk1, die Zellmorphologie (Marcus *et al.*, 1995). Shk1 verbindet beide Signalwege, indem es auf die MAP-Kinase-Kaskade wirkt. Die Aktivität von Ras1 wird durch die GEFs Efc25 und Ste6 reguliert. Efc25 aktiviert den Scd1/Cdc42-Weg und Ste6 den Signalweg über die MAP-Kaskade (Papadaki *et al.*, 2002). Die Deletions-Mutante von Ras1 ist lebensfähig, ist aber steril und bildet abnormale, runde Zellen aus (Fukui *et al.*, 1986). Ras1 von *S. pombe* ist nicht wie bei *S. cerevisiae* am cAMP-Weg beteiligt.

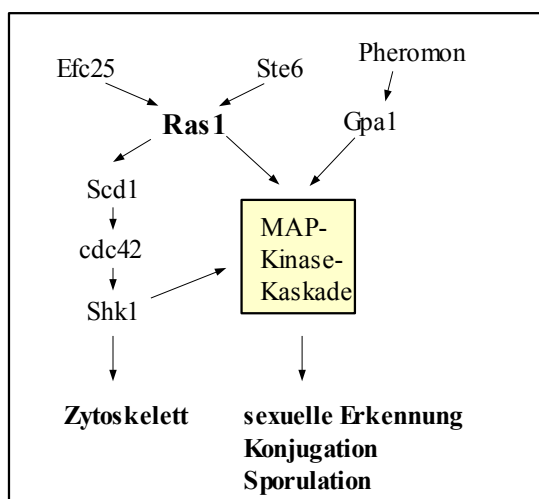


Abb. 2.6: Ras-Signaltransduktion bei *Schizosaccharomyces pombe*

Ras1 kann über zwei Signalwege, die miteinander gekoppelt sind, die Zellmorphologie und die sexuelle Erkennung regulieren.

In der humanpathogenen Hefe *Candida albicans* konnte ein homologes Ras-Protein isoliert werden (Feng *et al.*, 1999), das wie in der Hefe *S. cerevisiae* eine MAP-Kinase-Kaskade und einen cAMP/PKA-Weg anschalten kann (Leberer *et al.*, 2001). Über die Transkriptionsfaktoren Cph1 und Efg1 wird über beide Wege das filamentöse Wachstum und somit die Virulenz reguliert (Abb. 2.7). Die Deletion von Ras1 führt dazu, dass keine Hyphenbildung mehr erfolgt. Eine konstitutiv aktive Ras1 Mutante in *C. albicans* führt zu einem gesteigerten Hyphenwachstum (Feng *et al.*, 1999). Ras1 ist ebenfalls am polaren Hyphenwachstum beteiligt. Durch die Aktivierung von Cdc42 erfolgt die Aktivierung von Bni1 (Martin *et al.*, 2005). Das Protein Bni1, ein Formin, ist an der Zusammenlagerung von Aktinstränge beteiligt.

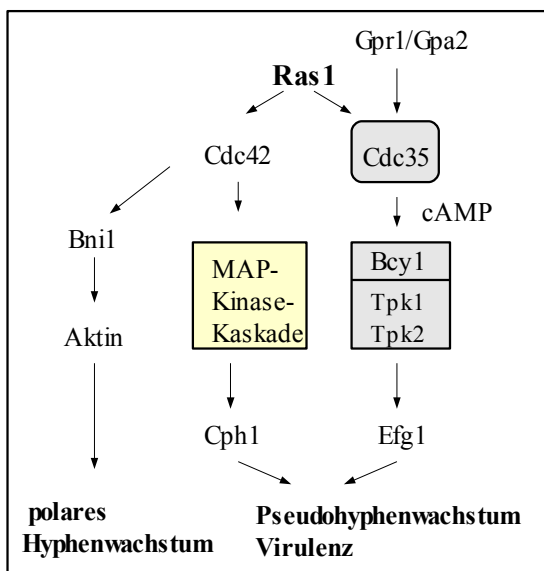


Abb. 2.7: Ras-Signalkaskade bei *Candida albicans*

Ras1 reguliert über eine MAP Kinase Kaskade und einen cAMP-Weg das vegetative Wachstum und die Virulenz von *C. albicans*. Über die Aktivierung von cdc42 und Bni1 erfolgt die Regulation des polaren Hyphenwachstums.

In der Basidiomyceten-Hefe *Cryptococcus neoformans* sind, wie in *S. cerevisiae*, zwei Ras- Proteine bekannt. Ras1 ist an der Regulation der Pheromonantwort, am filamentösem Wachstum und an der Regulation des Aktin-Zytoskeletts beim Wachstum bei erhöhter Temperatur beteiligt. Ras1 reguliert dabei die Agarpenetration und die Virulenz über den cAMP/PKA-Weg sowie das Kreuzungsverhalten, sowohl über eine MAP-Kinase-Kaskade als auch teilweise über den cAMP/PKA-Weg (Abb. 2.8). Die Expression eines dominant aktiven Allels von *ras1* resultiert in haploidem Fruchten bei der Reaktion auf Stickstoff-Limitierung und umfasst die Filamentbildung, Agarpenetration und Sporulation. Der Wachstumsdefekt bei erhöhter Temperatur wird über einen dritten Weg reguliert, durch Interaktion mit Cdc24, dem GEF von Cdc42 (Nichols *et al.*, 2007).

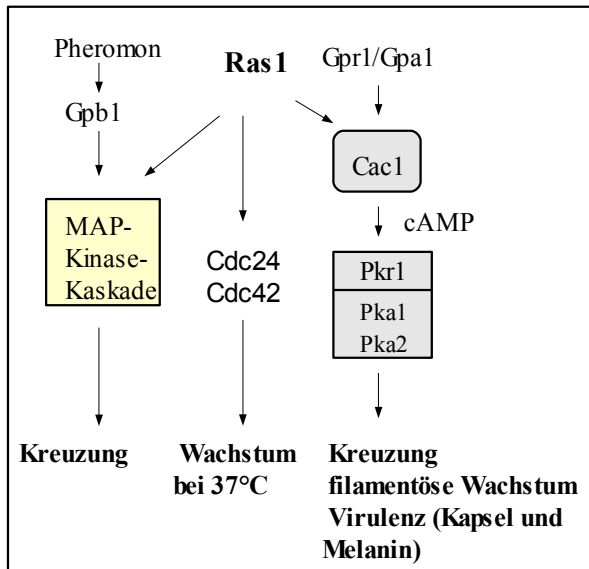


Abb. 2.8: Ras-Signalkaskade bei *Cryptococcus neoformans*

Ras1 aktiviert drei verschiedene Signalwege und reguliert das filamentöse Wachstum, die Kreuzung, die Virulenz und das Wachstum bei hohen Temperaturen von *C. neoformans*.

Die Deletion von *ras1* und *ras2* ist lebensfähig und zeigt einen Defekt beim Wachstum bei allen Temperaturen. Ras2 wird geringer exprimiert als Ras1 und die Deletion von *ras2* zeigt keinen erkennbaren Phänotyp (Alspaugh *et al.*, 2000, Waugh *et al.*, 2002 und 2003).

Im Heterobasidiomyceten *Ustilago maydis* sind zwei Ras-Proteine bekannt (Abb. 2.9). Ras2 reguliert die Pheromonantwort, das filamentöse Wachstum und die Virulenz des pflanzenpathogenen Pilzes über eine MAP-Kinase-Kaskade (Lee und Kronstad, 2002). Ras1 reguliert das Umschalten vom filamentösen Wachstum zur Hefeform und steigert die Pheromonexpression über einen cAMP-Weg (Müller *et al.*, 2003). Beide Wege sind miteinander über den Transkriptionsfaktor Prf1 verknüpft (Kahmann *et al.*, 1999).

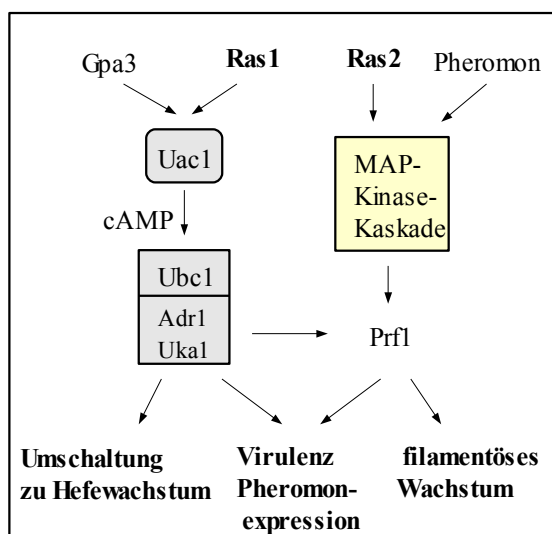


Abb. 2.9: Ras-Signaltransduktion bei *Ustilago maydis*

Die Aktivierung einer MAP-Kinase-Kaskade erfolgt über das Protein Ras2 und die Aktivierung des cAMP-Weges über Ras1. Ras1 und Ras2 kontrollieren in *U. maydis* das Umschalten von Hyphe zur Hefe, das filamentöse Wachstum, die Virulenz und die Pheromonexpression.

In verschiedenen anderen Pilzen wurden homologe Gene für Ras isoliert und charakterisiert. Aus dem filamentösen Ascomyceten *Aspergillus fumigatus* wurden zwei Ras-Gene isoliert, *rasA* und *rasB* (Fortwendel *et al.*, 2004). Beide Proteine sind an der Konidienkeimung und an der asexuellen Entwicklung beteiligt. Eine Funktion von RasB am polarem Wachstum wurde ebenfalls nachgewiesen (Fortwendel *et al.*, 2005). In *Aspergillus nidulans* wurde nur ein homologes Ras-Gen isoliert, *rasA* (Som und Kolaparthi, 1994). RasA in *A. nidulans* ist an der Entwicklung des Pilzes und der Sporenkeimung beteiligt (Osheroov und May, 2000), wobei RasA und der cAMP-Weg unabhängig voneinander arbeiten (Fillinger *et al.*, 2002).

In *Neurospora crassa* wurden die Gene *Nc-ras* (Altschuler *et al.*, 1990) und *Nc-ras2* (Kana-uchi *et al.*, 1997) isoliert. Es zeigte sich, dass die Deletion von *ras2* nicht essentiell für das Wachstum war, aber weniger Luftmyzel gebildet wurde, das eine verstärkte Seitenhyphenbildung aufwies. Nc-Ras2 reguliert in *N. crassa* das polare Hyphenwachstum, die Zellwandsynthese und die Konidienbildung (Kana-uchi, *et al.* 1997). Der pflanzenpathogene Pilz *Colletotrichum trifolii* besitzt ein Ras-Homolog (Truesdell *et al.*, 1999), welches am polaren Wachstum, der Konidien- und Appressorienbildung beteiligt ist (Memmott *et al.*, 2002; Ha *et al.*, 2003). Die Deletion von *ras* ist letal für den Pilz.

Weitere Ras-Proteine sind bekannt aus dem pflanzenpathogenen Pilz *Fusarium graminearum* (Ras1 und Ras2; Bluhm *et al.*, 2007), dem Ektomykorrhizapilz *Laccaria bicolor* (Sundaram *et al.*, 2003) und dem Basidiomyceten *Lentinula edodes* (Hori *et al.*, 1991). Interessanterweise konnte bei *L. edodes* festgestellt werden, dass Ras in unterschiedlichen Regionen des Fruchtkörpers (Hymenophoren) verschieden exprimiert wird (Tanaka *et al.*, 2005).

In verschiedenen Pilzen spielt Ras bei der Kreuzung und Morphogenese eine wichtige Rolle. Dabei kann Ras verschiedene Signalwege, wie die MAP-Kinase-Kaskade als auch den cAMP/PKA-Weg aktivieren. Es zeigt sich auch, dass Ras in Pilzen nicht immer essentiell ist, da nicht alle Deletionen letal sind. Durch die Untersuchungen eines GAP-Gens von Ras1 in *S. commune* konnten erste Erkenntnisse über die Ras-Signaltransduktion gewonnen werden. Eine nachfolgende Untersuchung des Ras1-Proteins sollte einen tieferen Einblick in die Signaltransduktionswege des Homobasidiomyceten *S. commune* erbringen.

2.3 Proteinkinase A

Eine zentrale Rolle in der sexuellen Entwicklung von Pilzen spielen das zyklische Adenosin-Monophosphat (cAMP) und die Proteinkinase A (PKA). Es ist bekannt, dass cAMP bei dem Pilz *S. commune* einen Einfluss auf die Fruchtkörperbildung hat (Schwalb, 1974). Wurde den Pilzen in einer frühen Entwicklungsphase 10^{-3} M cAMP gegeben, so zeigten die Fruchtkörper in einem späteren Entwicklungsstadium entweder keine oder abnormale Lamellen. Dies deutet auf einen über cAMP gesteuerten Entwicklungsverlauf hin. Der Signaltransduktionsweg, in dem cAMP für die Fruchtkörperbildung verantwortlich ist, ist allerdings bisher noch nicht bekannt.

Die Aktivierung der Proteinkinase A über den cAMP-Weg ist besonders gut untersucht in der Hefe *S. cerevisiae*. Die Zugabe von Glukose und anderen fermentierbaren Kohlenstoffquellen zu Zellen, die zuvor ohne Glukose gewachsen sind, führt zu einem schnellen, vorübergehenden Anstieg von cAMP in der Zelle. Diese Reaktion erfolgt über den Rezeptor Gpr1, der mit der $G\alpha$ -Untereinheit eines heterotrimeren G-Proteins (Gpa2) verbunden ist (Kraakman *et al.*, 1999; Thevelein und de Winde, 1999). Die Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels durch die Aktivierung der Adenylatzyklase Cyr1 kann durch Ras2 und Gpa2 erfolgen und reguliert das filamentöse Wachstum diploider Zellen (Abb. 2.5). Das Ziel von cAMP ist die cAMP-abhängige PKA. Im inaktiven Zustand liegt die PKA als Tetramer bestehend aus je zwei identischen regulatorischen und zwei katalytischen Untereinheiten vor. Bei Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels wird die PKA aktiviert, indem cAMP an die regulatorischen Untereinheiten bindet. Durch Konformationsänderungen werden die aktiven katalytischen Untereinheiten freigesetzt. Die katalytischen Untereinheiten phosphorylieren spezifisch Serin- oder Threoninreste von Effektorproteinen, die über eine konservierte PKA-Bindesequenz verfügen (Gibbs *et al.*, 1992). Je nach Funktion können die Effektoren nach der Phosphorylierung aktiviert oder deaktiviert werden. Die regulatorische Untereinheit von *S. cerevisiae* wird durch das Gen *BCY1* kodiert. Die Deletion des Gens *BCY1* führt zu einem gesteigerten filamentösen Wachstum (Pan & Heitman, 1999). Die katalytische Untereinheit wird von drei verschiedenen Genen *TPK1*, *TPK2* und *TPK3* kodiert (Toda *et al.*, 1987). Die Dreifachdeletion von *TPK1*, *TPK2* und *TPK3* ist letal für die Zelle. Die drei verschiedenen katalytischen Untereinheiten haben unterschiedliche Funktionen beim Pseudohyphenwachstum in *S. cerevisiae* (Robertson und Fink, 1998). Tpk1 und Tpk3 sind an der

negativen Regulierung des filamentösen Wachstums beteiligt, möglicherweise durch eine Rückkopplung, die die cAMP-Produktion inhibiert. Tpk2 reguliert das filamentöse Wachstum positiv, indem sie den Transkriptionsfaktor Flo8 reguliert, der wiederum die Expression von Flo11 bestimmt. Flo11 ist ein Zelloberflächenprotein, das für Pseudohyphenwachstum und haploides, invasives Wachstum benötigt wird. Weitere Funktionen von Tpk2 sind die negative Regulierung von Genen die an der Eisenaufnahme beteiligt sind, und die positive Regulierung von Genen des Trehaloseabbaus und der Regulierung der Wasser-Homöostase (Robertson *et al.*, 2000). Die Inaktivierung der PKA erfolgt durch Hydrolyse von cAMP durch die Phosphodiesterasen Pde1 und Pde2 (Nikawa *et al.*, 1987, Park *et al.*, 2005). Die regulatorischen PKA-Untereinheiten nehmen wieder ihre Ausgangskonformation ein, die eine hohe Affinität zur Bindung an die katalytischen Untereinheiten besitzt. Durch diese Bindung werden die katalytischen Untereinheiten inaktiviert und die Signalweiterleitung ist beendet (Taylor *et al.* 1990).

Einzelne Komponenten der cAMP-Signaltransduktionskaskade wurden auch in zahlreichen anderen Pilzen identifiziert. Pilze verwenden cAMP in einer Reihe von Prozessen, wie z.B. während der sexuellen Entwicklung, Sporenbildung, Virulenz und im sekundären Metabolismus.

In der Spalthefe *S. pombe* erfolgt die Aktivierung des cAMP-Weges, ähnlich wie bei *S. cerevisiae*, durch Bindung von Glukose an einen Rezeptor (Git3), der die G α -Untereinheit eines heterotrimeren G-Proteins aktiviert (Gpa2). Bei *S. pombe* ist jedoch kein Ras-Protein an der Aktivierung der Adenylatzyklase beteiligt (Lengeler *et al.*, 2000). Es wurden des weiteren die Gene für die katalytische Untereinheit der PKA, *pkal* (Maeda *et al.*, 1994) und das Gen für die regulatorische Untereinheit der PKA, *cgs1* (Young *et al.*, 1989) isoliert. Die cAMP-Kaskade reguliert die sexuelle Entwicklung und Sporulation in *S. pombe* (Hatanaka und Shimodo, 2001).

In der humanpathogenen Hefe *C. albicans* wurden die Gene für die Adenylatzyklase, *cdc35* (Rocha *et al.*, 2001), die regulatorische Untereinheit der PKA, *bcy1* (Cassola *et al.*, 2004) und die katalytischen Untereinheiten der PKA, *tpk1* und *tpk2* (Bockmühl *et al.*, 2001, Sonneborn *et al.* 2000) isoliert. Die Aktivierung der Adenylatzyklase erfolgt wie bei *S. cerevisiae* durch Bindung von Glukose an den G-Protein gekoppelten Rezeptor Gpr1, der die G α -Untereinheit eines heterotrimeren G-Proteins anschaltet (Maidan *et al.*, 2005). Parallel wird der cAMP-Weg von Ras1 angeschaltet (Abb. 2.7). Der cAMP-Weg in

C. albicans ist wichtig für das hyphale Wachstum und die Virulenz (Rocha *et al.*, 2001), wobei Tpk1 und Tpk2 unterschiedliche Funktionen besitzen. Tpk1 erlaubt die Hyphenbildung auf Festmedium und Tpk2 wird für die schnelle Hyphenbildung in Flüssigmedien gebraucht (Bockmühl *et al.*, 2001).

Der heterothallische Basidiomycet *Cryptococcus neoformans* ist ein humanpathogener Pilz, vor allem bei immunsupprimierten Patienten. Die cAMP-Signalkaskade in *C. neoformans* reguliert hauptsächlich die Bildung der Virulenzfaktoren Melanin und Kapsel (Alspaugh *et al.*, 1997 und 1998). Isolierte Komponenten des cAMP-Weges sind die Adenylatzyklase, Cac1 (Alspaugh *et al.*, 2002), die regulatorische Untereinheit der PKA, Pkr1, und die katalytischen Untereinheiten der PKA, Pka1 und Pka2 (D'Souza *et al.*, 2001; Hicks *et al.*, 2004). Die Aktivierung des cAMP-Weges erfolgt wie bei *S. cerevisiae* über einen G-Protein gekoppelten Rezeptor (Gpr1) und über ein Ras-Protein (Abb. 2.8).

Im dimorphen Basidiomycet *Ustilago maydis* reguliert der cAMP-Weg die Virulenz und das Umschalten vom filamentösem Wachstum zum hefeartigen Wachstum. Die Aktivierung der Adenylatzyklase erfolgt über Ras2 und Gpa3, der G α -Untereinheit eines heterotrimeren G-Proteins (Abb. 2.9). Isoliert wurden die Gene für die Adenylatzyklase, *uac1* (Gold *et al.*, 1994), die regulatorische PKA-Untereinheit *ubc1* (Gold *et al.*, 1997) und die Gene für die katalytischen Untereinheiten der PKA, *adr1* und *uka1* (Ort *et al.*, 1995; Dürrenberger *et al.*, 1998). Die Ausschaltung des Gens *adr1* führt zu einem konstitutiven filamentösen Phänotyp. Die Deletion von *uka1* hat keinen Effekt auf die Zellmorphologie und ist nur gering an der Pathogenität beteiligt (Dürrenberger *et al.*, 1998).

Im filamentösen Ascomyceten *Aspergillus nidulans* wurden die Gene *pkaA* und *pkaB*, die für die katalytische Untereinheit der PKA kodieren (Shimizu und Keller, 2001; Ni *et al.*, 2005), und das Gen *cyaA*, welches für die Adenylatzyklase kodiert (Fillinger *et al.*, 2002), identifiziert. Die cAMP-Signaltransduktion reguliert in diesem Organismus verschiedene morphogenetische Prozesse, wie z.B. die asexuelle Entwicklung von Konidien. PkaA reguliert das vegetative Wachstum und die Sporenkeimung positiv, während sie einen negativen Effekt auf die asexuelle Sporulation zeigt. Obwohl die Deletion von *pkaB* keinen offensichtlichen Phänotyp zeigt, ist die Deletion beider katalytischen Untereinheiten letal (Ni *et al.*, 2005).

In *Aspergillus niger* wurden das Gen *pkaR*, welches für die regulatorische Untereinheit der PKA kodiert (Štaudohar *et al.*, 2002), und das Gen *pkaC*, welches für die katalytische Untereinheit der PKA kodiert (Benčina *et al.*, 1997), isoliert. PkaC und PkaR sind an der Sporulation beteiligt und PkaC am polaren Wachstum.

Ebenfalls eine katalytische Untereinheit der PKA, *pkaC* wurde in *Aspergillus fumigatus* identifiziert (Oliver *et al.*, 2001). Weitere Komponenten der cAMP-Signalkaskade, die aus diesem Pilz isoliert wurden, sind die regulatorische Untereinheit der PKA, *pkaR* (Oliver *et al.*, 2001) und die Adenylatzyklase, *acyA* (Liebmann *et al.*, 2003). Die cAMP-Kaskade in *A. fumigatus* ist beteiligt am Wachstum und der Konidienbildung (Zhao *et al.*, 2006), ebenso an der Ausbildung der Virulenz (Liebmann *et al.*, 2003 und 2004) .

Im Ascomyceten *Neurospora crassa* wurden die Gene für die Adenylatzyklase, *cyoA* (Kore-eda *et al.*, 1991), die regulatorische Untereinheit der PKA, *mcb-1* (Bruno *et al.*, 1996) und die katalytischen Untereinheiten der PKA, *pkac-1* und *pkac-2* (Banno *et al.*, 2005) isoliert. cAMP-Signaltransduktionsprozesse spielen in *N. crassa* eine wichtige Rolle in der Regulation morphologischer Vorgänge, wie Konidienbildung und Paarung, aber auch in der Reaktion auf Hitzeschock und oxidativen Stress (Lengeler *et al.*, 2000).

Es zeigt sich, dass der cAMP/PKA-Weg in verschiedenen Pilzgruppen eine wichtige Signaltransduktionskaskade darstellt. Dabei ist festzustellen, dass Deletionen katalytischer Untereinheiten in der Zelle verschiedene Phänotypen auslösen können. Da die einzelnen Komponenten zwischen verschiedenen Pilzen stark konserviert sind, wird erwartet, dass *Schizophyllum commune* eine homologe Signaltransduktionskaskade enthält.

2.4 Ziele der Arbeit

In zahlreichen Pilzen konnte eine Regulation zellulärer Prozesse, wie Stoffwechsel, Wachstum und Differenzierung durch konservierte Signaltransduktionskaskaden nachgewiesen werden. Zwei wichtige Signalwege sind dabei die MAP-Kinase-Kaskade und der cAMP/PKA-Weg. Arbeiten in *S. commune* haben gezeigt, dass eine RasGTPase (*gap1*) Einfluss auf das vegetative Wachstum und die Fruchtkörperbildung hat. Das Ziel dieser Arbeit sollte die Untersuchung von Ras1 in der Entwicklung des Homobasidiomyceten *S. commune* sein. Ebenso sollte der Nachweis der Beteiligung von Ras1 in der cAMP-Signaltransduktionskaskade erbracht werden. Die Charakterisierung von Ras1 sollte anhand von verschieden konstitutiv aktivierten Allelen erfolgen. Die Phänotypen der konstitutiv aktiven Mutanten sollten mit denen der $\Delta gap1$ -Stämme

verglichen werden, um Aussagen zur Ras-regulierten Entwicklung in *S. commune* und die Beteiligung an verschiedenen Signaltransduktionswegen zu machen. Als weiteres Gen sollte die katalytische Untereinheit der PKA, *tpk*, isoliert und charakterisiert werden. Intrazelluläre cAMP-Konzentrationen sollten untersucht werden, um einen möglichen Einfluss von Ras auf eine cAMP-vermittelte Signaltransduktion zu zeigen.

3. Material

3.1 Chemikalien und Enzyme

Die Chemikalien, Lösungsmittel, Puffer, Antibiotika, Reagenzien und Medien, die in dieser Arbeit verwendet wurden, stammen, falls im Text nicht anders vermerkt, von den Firmen Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen), Merck AG (Darmstadt), Fisher Scientific (Schwerte), Roche Diagnostics (Mannheim), Roth GmbH & Co. (Karlsruhe), Boehringer (Mannheim), Cayla (Toulouse, FRA) und Riedel de Haën AG (Hannover).

DNA-modifizierende Enzyme wurden von JenaBioscience (Jena), peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen), Bioline (Luckenwalde), New England Biolabs (Schwalbach), Genomed (Bad Oeynhausen), Invitrogen (Karlsruhe) und GE Healthcare (Uppsala, SWE) bezogen, Oligonukleotide von MWG-Biotech (Ebersberg).

AK Maus anti- α -Tubulin und Anti-Maus-IgG-FITC-Konjugat stammten von der Firma Sigma-Aldrich (Steinheim).

3.2 Lösungen und Medien

Die in dieser Arbeit verwendeten Lösungen und Medien waren wie in Tabelle 1 und 2 aufgelistet zusammengesetzt. Als Lösungsmittel wurde, soweit nicht gesondert vermerkt, *Aqua dest.* verwendet.

Tabelle1: Lösungen

Puffer für die Nukleinsäureanalytik	
20 x TAE-Puffer (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	0,8 M Tris/Acetat; pH 8,0 20 mM EDTA
Ladepuffer für Agarosegele (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	0,2 % Bromphenolblau 0,2 % Orange G 0,2 % Xylencyanol FF 50 % Saccharose 1 mM EDTA
Lösungen für die Plasmidpräparation	
SolA (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	50 mM Glukose 25 mM Tris/HCl, pH 8,0 10 mM EDTA, pH 8,0
SolB (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	0,2 M NaOH 1 % SDS

SolC (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	7,5 M NH ₄ Acetat pH 7,8
Puffer für die Nukleinsäure-Extraktionen	
DNA-Extraktionspuffer (DEP) (Ausubel <i>et al.</i> , 1999)	100 mM Tris/HCl, pH 8,0 50 mM EDTA, pH 8,0 2 % SDS
CTAB/NaCl-Lösung (Ausubel <i>et al.</i> , 1999)	10 % CTAB 0,7 M NaCl
DNA-Extraktionspuffer für die Schnellisolierung	200 mM Tris/HCl pH 8,5 250 mM NaCl 25 mM EDTA 0,5 % SDS
TE-Puffer (Ausubel <i>et al.</i> , 1999)	10 mM Tris/HCl, pH 8,0 1 mM EDTA
RNA-Extraktionspuffer (REP) (Wendland <i>et al.</i> , 1996)	4 % SDS 0,15 M NaAcetat, pH 5,0
Lösungen für die Southern-Blot-Hybridisierung	
Maleinsäurepuffer	100 mM Maleinsäure 150 mM NaCl pH 7,5
Denaturierungslösung	0,5 M NaOH 1,5 M NaCl
Neutralisierungslösung (Southernblot)	0,5 M Tris/HCl 3 M NaCl pH 7,5
Neutralisierungslösung (Koloniehybridisierung)	1 M Tris/HCl 1,5 M NaCl pH 7,5
Detektionspuffer	10 mM Tris/HCl, pH 9,0 10 mM NaCl
20 x SSC (Southern, 1975)	0,3 M Na ₃ Citrat 3 M NaCl pH 7 - 8
DIG-Standardhybridisierungspuffer (Boehringer, Mannheim)	5x SSC 0,1 % N-Lauroylsarcosin 0,02 % SDS 1 % Blocking-Reagenz (Boehringer, Mannheim)
Blockingreagenz	0,1 M Maleinsäure, pH 7,5 0,15 M NaCl 1 % Blocking-Reagenz
2 x Wash	2x SSC 0,1 % SDS

0,5 x Wash	0,5x SSC 0,1 % SDS
Detektions-Waschpuffer	0,1 M Maleinsäure, pH 7,5 0,15 M NaCl 0,3 Vol.-% Tween 20
Puffer für Protein-Isolierung	
Proteinextraktionspuffer	25 mM Tris/HCl 1mM DTT 1 mM EDTA pH 7,4
Lösungen für Mikroskopie (nach Fischer & Timberlake, 1995; Raju, 1982)	
Einbettungsmedium für DAPI	0,1 M Tris/HCl 50 % Glycerin 1 mg/ml Phenylendiamin pH 8,0
PME-Lösung	50 mM PIPES, pH 6,7 25 mM EGTA, pH 8,0 5 mM MgSO ₄
TBS-Puffer	20 mM Tris/HCl, pH 7,6 137 mM NaCl 0,1 Vol.-% Tween 20
Novozymlösung	30 mg Novozym 500 µl PME 500 µl Eiweiß 1-1,5 h bei RT inkubieren
Fixierlösung	PME + 4 Vol.-% Formaldehyd
Extraktionslösung	100 mM PIPES, pH 6,7 25 mM EGTA, pH 8,0 0,1 % Igepal
Puffer für Transformation von <i>S. commune</i>	
1 M MgSO ₄	1 MgSO ₄ 20 mM MES pH 5,9
0,5 M MgSO ₄	0,5 M MgSO ₄ 20 mM MES pH 6,3
1 M Sorbitol	1 M Sorbitol 20 mM MES
PEG	44 % PEG 4000 20 mM MES; pH 6,3

Lösungen für die Mikrotomschnitte (Gube, 2007)

Pfeiffer's Gemisch	Methanol (absolut) 10 % Essigsäure 40 % Formaldehyd Verhältnis 1:1:1
--------------------	---

Tabelle 2: Medien (alle Angaben pro Liter)

Medien für <i>S. commune</i>	
CYM (Complex Yeast Medium, Schwalb und Miles, 1967)	2 g Trypticase Pepton 2 g Hefeextrakt 20 g Glukose 0,5 g MgSO ₄ x 7 H ₂ O 0,5 g KH ₂ PO ₄ 1 g K ₂ HPO ₄
CYM-T	wie CYM + 4,8 mM L-Tryptophan
CYM-CMC	2 g Trypticase Pepton 2 g Hefeextrakt 10 g Carboxymethylcellulose-Natriumsalz 0,5 g MgSO ₄ x 7 H ₂ O 0,5 g KH ₂ PO ₄ 1 g K ₂ HPO ₄
MM (Minimalmedium)	2 g Asparaginsäure 20 g Glukose 0,5 g MgSO ₄ 0,5 g KH ₂ PO ₄ 1 g K ₂ HPO ₄ 120 µg Thiaminhydrochlorid pH 6,3
Medien für <i>E. coli</i>	
Standard I-Medium (Roth GmbH, Karlsruhe)	15 g Pepton 3 g Hefeextrakt 6 g NaCl 1 g Glukose pH 7,5
SB-Medium	32 g Trypton 20 g Hefeextrakt 5 g NaCl pH 7,0
Medien für die Transformation von <i>S. commune</i>	
rescue-Medium	wie CYM + 0,8 M Sorbitol pH 6,3
Top-Agar	wie rescue-Medium 0,8 % Agar Agar

3.3 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3: Oligonukleotide

	Sequenz (5'->3'-Orientierung)
Primer für die Amplifizierung von <i>ras1</i>	
Rasdown1	GAC CGC AGC CCC CTC CTT CTC
Rasup2	CTG AAG CAA GAC AGC GAC GGC AGA
RasPromdown	GGT GTG CAA TGA TTT CCT TCG TGA TG
Primer für die <i>ras1</i>-Mutagenese	
G12V-1	GCA GTA CTA GGC GAT GTT GGG GTG GGC AAA ACC GC
G12V-2	GCG GTT TTG CCC ACC CCA ACA TCG CCT AGT ACT GC
Q61L-1	TCA TAG ACA CTG CCG GAC TGG GTG CGT GCT TGC AC
Q61L-2	GTG CAA GCA CGC ACC CAG TCC GGC AGT GTC TAT GA
G15N-1	CGA TGG TGG GGT GAA CAA AAC CGC TCT CGC AGT C
G15N-2	GAC TGC GAG AGC GGT TTT GTT CAC CCC ACC ATC G
Primer für die TAIL-PCR	
TAIL1	(AGCT) GTC GA(GC) (AT) GA (AGCT) A (AT) GAA
TAIL2	(AGCT) CAG CT (AT) (GC) CT (AGCT) T (GC) CTT
TAIL3	GT (AGCT) CGA (GC) (AT) CA (AGCT) A (AT) GTT
TAIL4	CA (AGCT) GC (AGCT) (AT) (GC) GT (AGCT) T (GC) CAA
TAIL5	(AT) GTG (AGCT) AG (AT) A (AGCT) CA (AGCT) AGA
TAIL6	(GC) CAC (AGCT) TC (GC) T (AGCT) GT (AGCT) TCT
RasPromup	GAG GGC GTG AGC GTC GTG
Rasup1	TGG CGA TGA GCA GAC AGT CGA GTC
Tpkdown4	GCT CTA CTC CAT CGA CCT CAT CCG
Tpkdown5	CCC AAC TTC ACG CCC TAC TCC ATC
Tpkdown6	GGA AGT GAG CCC GCC GTA TA
Tpkdown7	CCA GTT CCC CGA CTT TGA CTA CAC
Primer für die Fusions-PCR	
ScCell1down	ATA GCT GTG TGA CTC TGT GAC ATA CGT AAC GC
ScCell1Ras	TAG TAC TGC AAC TCT CCA GTT GTC CAT TGC CGA AGT CGG TTG GTG GTC
RasATG	GAC AAC TGG AGA GTT GCA GTA CTA GGC GA

Primer für die qRT-PCR	
28S-1	CCG CAG CAG GGT CTC CAA GGT GAA C
28S-2	GCC CCG AAG AGC AGC CAA GGT C
tef-1	AGC TTG GCA AGG GTT CCT TCA
tef-2	AAC TTC CAG AGG GCG ATA TCA
ras-1	ATA AAA TGT GCT TCG TGG AGG TCA
ras-2	TCG TAG GTC TTG TCG CAC TTG TTC
tpk-1	AAT CGG CTG CAC CTG TTC TCG
tpk-2	CAT GTT CCG CTC GTT GTT GTT G

3.4 Plasmide und Organismen

In Tabelle 4 und 5 sind die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren, Organismen und Stämme aufgeführt.

Tabelle 4: Vektoren

Bezeichnung	Typ	Herkunft
pBluescript SK+	Klonierungsvektor, Amp ^R	Stratagene (Gronigen, NL)
pDrive	Klonierungsvektor, Amp ^R	Qiagen (Hilden)
pCHI	<i>ura1</i> in pT7 T3α18	Lengeler (1994)
ptrp	4,5 kb Fragment von <i>trp1</i> aus dem Cosmid pTC20 in pBluescript SK+	Muñoz-Rivas <i>et al.</i> , 1986
pRaswt	1,3 kb Fragment aus 4-40 in pDrive	diese Arbeit
pRasG12V	pRaswt durch <i>in vitro</i> Mutagenese G12V erzeugt	diese Arbeit
pRasQ61L	pRaswt durch <i>in vitro</i> Mutagenese Q61L erzeugt	diese Arbeit
pRasG15N	pRaswt durch <i>in vitro</i> Mutagenese G15N erzeugt	diese Arbeit
Raswt / ptrp	1,3 kb <i>EcoRI</i> Fragment aus pRaswt in ptrp	diese Arbeit

RasG12V / ptrp	1,3 kb <i>Eco</i> RI Fragment aus pRasG12V in ptrp	diese Arbeit
RasQ61L / ptrp	1,3 kb <i>Eco</i> RI Fragment aus pRasQ61L in ptrp	diese Arbeit
RasG15N / ptrp	1,3 kb <i>Eco</i> RI Fragment aus pRasG15 in ptrp	diese Arbeit
Raswt / pCHI	1,3 kb <i>Eco</i> RI Fragment aus pRaswt in pCHI	diese Arbeit
RasG12V / pCHI	1,3 kb <i>Eco</i> RI Fragment aus pRasG12V in pCHI	diese Arbeit
RasQ61L / pCHI	1,3 kb <i>Eco</i> RI Fragment aus pRasQ61L in pCHI	diese Arbeit
RasG15N / pCHI	1,3 kb <i>Eco</i> RI Fragment aus pRasG15N in pCHI	diese Arbeit
pCelRaswt	0,8 kb Fragment aus pRaswt mit 1,0 kb <i>cell</i> Promotor	diese Arbeit
pCelRasG12V	0,8 kb Fragment aus pRasG12V mit 1,0 kb <i>cell</i> -Promotor	diese Arbeit
pCelRasQ61L	0,8 kb Fragment aus pRasQ61L mit 1,0 kb <i>cell</i> -Promotor	diese Arbeit
pCelRasG15N	0,8 kb Fragment aus pRasG15N mit 1,0 kb <i>cell</i> -Promotor	diese Arbeit
CelRaswt / pCHI	1,8 kb <i>Eco</i> RI Fragment aus pCelRaswt in pCHI	diese Arbeit
CelRasG12V / pCHI	1,8 kb <i>Eco</i> RI Fragment aus pCelRasG12V in pCHI	diese Arbeit
CelRasQ61L / pCHI	1,8 kb <i>Eco</i> RI Fragment aus pCelRasQ61L in pCHI	diese Arbeit
CelRasG15N / pCHI	1,8 kb <i>Eco</i> RI Fragment aus pCelRasG15N in pCHI	diese Arbeit
p44S	2,03 kb <i>Sac</i> I Fragment aus <i>S. commune</i> 4-40 in pBluescript SK+	diese Arbeit

Tabelle 5: Verwendete Organismen und Stämme

Bezeichnung	Genotyp	Herkunft
<i>Escherichia coli</i> K12 DH5 α	F ⁻ , <i>endA1</i> , <i>hsdRA</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , ϕ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15	Gibco Life Technologies (Karlsruhe)
<i>Schizophyllum commune</i> 4-40	<i>matA4,6</i> ; <i>matB1,1</i>	Pilz Referenz Zentrum, Jena Jena
<i>S. commune</i> 12-43	<i>matA3,5</i> ; <i>matB2,2</i> ; <i>ura</i> -	Pilz Referenz Zentrum, Jena Jena
<i>S. commune</i> T2	<i>matA4,1</i> ; <i>matB2,2</i> ; <i>ura</i> -, <i>trp</i> -	Pilz Referenz Zentrum, Jena Jena
<i>S. commune</i> T62	<i>matA3,5</i> ; <i>matB7,2</i> <i>ura</i> -	Pilz Referenz Zentrum, Jena Jena
<i>S. commune</i> 4-39	<i>matA1,1</i> ; <i>matB3,2</i>	Pilz Referenz Zentrum, Jena Jena
<i>S. commune</i> W21	<i>matA1,1</i> ; <i>matB1,1</i>	Pilz Referenz Zentrum, Jena Jena
F28	<i>matA4,6</i> ; <i>matB3,2</i> ; Δ <i>gap1</i>	Schubert <i>et al.</i> (2006)
F15	<i>matA1,1</i> ; <i>matB1,1</i> ; Δ <i>gap1</i>	Schubert <i>et al.</i> (2006)
F20	<i>matA4,6</i> ; <i>matB3,2</i> ; Δ <i>gap1</i>	Schubert <i>et al.</i> (2006)
<i>S. commune</i> II-1	<i>matA1,1</i> ; <i>matB3,2</i> ; <i>ura</i> -; <i>trp</i> -	Schubert <i>et al.</i> (2006)
<i>S. commune</i> T2 ^{G12V}	<i>matA4,1</i> ; <i>matB2,2</i> ; <i>ura</i> -	diese Arbeit
<i>S. commune</i> II1 ^{Q61L}	<i>matA4,6</i> ; <i>matB1,1</i> ; <i>ura</i> -	diese Arbeit
<i>S. commune</i> II1 ^{G12V}	<i>matA4,6</i> ; <i>matB1,1</i> ; <i>trp</i> -	diese Arbeit
<i>S. commune</i> CellT62 ^{G12V}	<i>matA3,5</i> ; <i>matB7,2</i>	diese Arbeit

4. Methoden

4.1 Arbeiten mit *Escherichia coli*

4.1.1 Anzucht

Die Anzucht von *E. coli*-Kulturen erfolgte aerob auf einem Schüttelinkubator bei 37°C in Standard I-Medium (Roth), dem nach Bedarf 100 µg/ml Ampicillin zugefügt wurde. Für die Kultivierung auf Festmedien wurde den Lösungen Agar Agar (1,8 %) zugegeben. Als Indikatorplatten für die Klonierungsvektoren wurden Standard I/Ampicillin-Festmedien verwendet, denen zusätzlich 40 µg/ml 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- α -D-galaktosid (X-Gal, gelöst in Dimethylsulfoxid) zugegeben worden war.

4.1.2 Präparation von Plasmid-DNA (Birnboim und Doly 1979)

Für die Gewinnung von Plasmid-DNA mittels alkalischer Lyse wurden 2 ml-Kulturen von *E. coli* über Nacht bei 37°C in Selektivmedium angezogen. Nach Zentrifugation (30 s bei 13000 rpm) wurden die Zellen in 200 µl SolA vollständig resuspendiert. Diese Suspension wurde mit 400 µl SolB gemischt und 3 min bei RT inkubiert. Nach Hinzufügen von 300 µl eiskalten SolC und Inkubation für 5 min auf Eis wurde der Ansatz zentrifugiert (20 min bei 13000 rpm). Zur Fällung der DNA wurde der Überstand mit 0,7 Vol Isopropanol versetzt und 20 min auf Eis gestellt. Nach der Zentrifugation (20 min bei 13000 rpm) wurde die DNA mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 40 µl H₂O aufgenommen.

Bei der Isolierung größerer Mengen an Plasmid-DNA wurden die oben genannten Volumina vergrößert (für 200 ml Kultur: 10 ml SolA, 20 ml SolB, 15 ml SolC). Zusätzlich wurde die RNA durch Fällung mit 1 Vol 5 M LiCl für 30 min bei 0°C aus der Lösung entfernt. Nach der Zentrifugation (30 min, 11000 rpm, 4°C) wurde der Überstand abgenommen und die DNA mit 0,7 Vol Isopropanol gefällt. Nach der Zentrifugation (30 min, 11000 rpm, 4°C) wurde die DNA mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 1 ml TE-Puffer aufgenommen.

Sollte die DNA für eine nachfolgende Sequenzierung besonders rein sein, erfolgte die Isolierung mit dem E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit I (peqlab, Erlangen) nach Angaben des Herstellers.

4.1.3 Transformation von *E. coli* mittels Elektroporation (Calvin und Hanawalt, 1988; Dower *et al.*, 1988)

Das Einbringen von Plasmid-DNA in *E. coli*-Zellen erfolgte durch Elektroporation. Elektrokompetente Zellen wurden hergestellt, indem 500 ml SB-Medium mit 0,1 %iger Zellsuspension aus einer über Nacht gewachsenen Kultur angeimpft wurden. Diese Kultur wurde bei 37°C unter Schütteln inkubiert, bis OD₅₉₀ 0,7 und anschließend für 15 min auf Eis abgekühlt. Nach Zentrifugation (20 min, 4000 rpm, 4°C) wurden die Zellen einmal mit eiskalten *Aqua dest.* und zweimal mit eiskaltem 10 %igen Glycerin gewaschen. Danach erfolgte die Resuspension des Pellets in 2 ml Glycerin. Aliquots der Zellsuspension von je 100 µl wurden bis zum Gebrauch bei -80°C gelagert.

Zur Transformation wurden elektrokompetente Zellen auf Eis aufgetaut, mit der zu transfizierenden DNA gemischt und in die gekühlte Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand 2 mm) überführt. An die Küvetten wurde in einem Gene Pulser (E-C Apparatus Corporation, Holbrook, USA) eine Spannung von 2,8 kV bei 25 µF und 220 Ω angelegt. Danach wurde der Transformationsansatz in 900 µl Standard I-Medium aufgenommen und mindestens 30 min bei 37°C zur Ausbildung der Antibiotikaresistenz inkubiert. Ein Teil des Ansatzes wurde auf Selektivplatten ausplattiert.

4.2 Arbeiten mit *Schizophyllum commune*

4.2.1 Anzucht

Für die Anzucht auf Festmedien wurden ca. 0,4 cm² große Agarblöckchen ausgeschnitten, auf eine Platte überimpft und für 5-10 Tage bei 28°C inkubiert. Für Kreuzungsexperimente wurden die Platten für fünf Tage bei 28°C im Dunkeln inkubiert und danach mit Licht bei RT.

Die Anzucht von *S. commune* in Flüssigmedium erfolgte aerob bei 28°C für 4-5 Tage in entsprechenden Medium (CYM oder MM) auf einem Schüttelinkubator. Angeimpft wurden die Flüssigkulturen mit ca. 1-2 cm² gut bewachsenem Agarblöckchen einer Oberflächenkultur pro 100 ml Kultur. Das Myzel wurde für 1 min in einem Labormixer (Laboratory Blender, Waring Commercial, Conneticut, USA) zerkleinert. Die Zerkleinerung wurde in der Regel nach 1-2 Tagen wiederholt und 100–200 ml Medium zugegeben.

4.2.2 Präparation genomischer DNA

4.2.2.1 CTAB-Methode (Ausubel *et al.*, 1999; Rozman und Komel, 1994)

Das Myzel aus einer Flüssigkultur wurde über eine Nylonmembran (Maschenweite 41µm, Technische Gewebe Sommer, Balingen) abfiltriert, mit H₂O gewaschen und zwischen Papiertüchern getrocknet. Zur Extraktion genomischer DNA wurden 3 g Myzel in flüssigem Stickstoff zermörsert und mit 10 ml DEP für 1 h bei 65°C unter gelegentlichem Invertieren inkubiert. Die Zellrückstände wurden abzentrifugiert (10 min bei 11000 rpm) und der Salzgehalt des Überstands mit 5 M NaCl-Lösung auf 0,7 M eingestellt. Nach Zugabe von 0,1 Vol CTAB/NaCl für die Komplexierung der Proteine wurde die Lösung 15 min bei 65°C inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Zur Ausfällung der Proteine und Polysaccharide wurde 1 Vol Chloroform zugegeben und nach Zentrifugation (10 min, 11000 rpm, 4°C) die wässrige Phase mit der DNA abgenommen. Die Schritte ab der Zugabe von CTAB/NaCl wurden zwei- bis dreimal wiederholt, bis die Interphase nach der Zentrifugation klar blieb. Die DNA wurde im Anschluß mit 0,7 Vol Isopropanol gefällt (30 min, 11000 rpm, 4°C), mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 1 ml TE-Puffer aufgenommen.

Zur Überprüfung der DNA-Qualität wurden 5 µl auf einem 0,8 %igem Agarose-Gel aufgetrennt.

4.2.2.2 Schnellisolierung genomischer DNA (nach Ceniz, 1992)

Für Isolierung von geringen Mengen DNA für die PCR wurde eine Schnellmethode zur Isolierung verwendet. 4-5 cm² Myzel wurde von einer Platte abgenommen und in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Nach Zugabe von 300 µl Extraktionspuffer und etwas Quarzsand (Riedel de Haën) wurde das Myzel mit einem Glasstab zermörsert. Nach Zugabe von 150 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,2) wurde das Eppendorf-Gefäß für 10 min bei -20°C inkubiert und danach zentrifugiert (5 min, 13000 rpm). Der Überstand wurde abgenommen, mit 0,7 V Isopropanol versetzt und erneut zentrifugiert (20 min, 13000 rpm). Das Pellet wurde getrocknet und in 50 µl TE-Puffer oder H₂O aufgenommen.

4.2.2.3 Messung der Nukleinsäure-Konzentration (Lottspeich & Zorbas, 1998)

Die Konzentrationsbestimmung von DNA- und RNA-haltigen Lösungen erfolgte durch Extinktionsmessung an einem Spektralphotometer (Unicam Helios Gamma & Delta, Cambridge, UK) bei einer Wellenlänge von 260 nm. Gemessen wurde die Extinktionsdifferenz zwischen nukleinsäurehaltiger Lösung und Lösungsmittel. Einer $OD_{260}=1$ entsprechen dabei ca. 50 µg/ml dsDNA und 40 µg/ml RNA.

Zur Abschätzung der Verunreinigung durch Proteine wurde zusätzlich die Extinktion bei 280 nm bestimmt. Bei einem Verhältnis von OD_{260} zu OD_{280} von 1,8 für DNA bzw. 2,0 für RNA wurde von einer ausreichend proteinfreien Lösung ausgegangen.

4.2.3 Präparation Gesamt-RNA (Wendland *et al.*, 1996)

Um Verunreinigungen mit aktiver RNase zu verhindern, wurden Puffer, Lösungen und *Aqua dest.* mit 0,1 % DEPC angesetzt, 12 h bei RT gerührt und anschließend 20 min bei 121 °C und 1 bar autoklaviert, wobei das DEPC zerfällt. DEPC bewirkt eine irreversible Carbonylierung von Aminogruppen und inaktiviert auf diese Weise Enzyme.

Das Pilzmyzel wurde in flüssigem Stickstoff zermörsert und das Pulver in einem Gemisch aus mit Wasser gesättigtem Phenol, Chloroform und REP im Verhältnis 1:1:2 aufgenommen (0,75 ml auf ~ 50 mg Myzel). Das Gemisch wurde 30-60 min auf Eis gestellt, gelegentlich invertiert und anschließend zentrifugiert (10 min, 13000 rpm, 4°C). Die wässrige Phase wurde zweimal mit einem Phenol/Chloroform-Gemisch (1:1) und dann zweimal mit Chloroform extrahiert. Die RNA wurde über Nacht mit 2,5 Vol 98 % igen Ethanol bei -80°C gefällt. Nach Zentrifugation (30 min, 13000 rpm, 4°C) wurde das Pellet in DEPC-H₂O aufgenommen. Anschließend erfolgte die Behandlung der RNA mit dem „DNA-free Kit“ von Ambion (Austin, USA) zur Entfernung der restlichen DNA nach Angaben des Herstellers. Die RNA wurde in Aliquots aufgeteilt und bei -80°C gelagert.

Zur Kontrolle der Qualität der RNA wurden 2-8 µl RNA auf ein 0,8 % Agarose-Gel aufgetragen. Gelkammer und der Gelkamm wurden für 1 h mit 3 % H₂O₂ behandelt. Die RNA wurde für 10 min bei 8,5 V/cm aufgetrennt und das Gel 10 min in Ethidiumbromid (1mg/ml) gefärbt.

4.2.4 Isolierung von Proteinen zur Bestimmung der Proteinkinase A-Aktivität

Pilzmyzel wurde in flüssigen Stickstoff gemörsert. 1 g Pulver wurde in 4 ml Proteinextraktionspuffer aufgenommen und 15 min auf Eis inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (10 min, 13000 rpm, 4°C) wurde der Überstand mit der löslichen Fraktion an Proteinen abgenommen, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Zur Erstellung einer Eichgeraden wurden verschiedene Verdünnungen zwischen 0,02 und 1,2 µg/ml von BSA hergestellt, wobei 20 µl in die Messung eingesetzt wurden. Nach Zugabe von 1 ml Bradford-Reagenz erfolgte eine Inkubation der Proben von 3 min bevor die Absorption bei 595 nm photometrisch ermittelt wurde.

Zur Ermittlung der Proteinkonzentration von *S. commune*-Proteinrohextrakten wurden diese 1:100 verdünnt. 20 µl dieser Verdünnung wurden mit 1 ml Bradford-Reagenz versetzt und genau wie die Proben für die Eichgerade behandelt. Mittels der Eichgeraden und unter Einbeziehung des Verdünnungsfaktors wurde dann die Proteinkonzentration berechnet. (Bradford, 1976)

4.2.5 Transformation von *S. commune* (Specht *et al.*, 1988)

2-3 Tage alte Flüssigkultur (200 ml) wurde abzentrifugiert (15 min, 4000 rpm), das Myzel zweimal mit 1 M MgSO₄ gewaschen und in 20 ml der gleichen Lösung aufgenommen. Nach Zugabe von 0,1 g zellwandlytischem Enzym Caylase C3 aus *Tolypocladium geodes* (Cayla) wurde das Myzel 4 h oder ÜN bei 30°C unter leichtem Schütteln (70 rpm) inkubiert. Die Zugabe von 1 Vol *Aqua dest.* und weitere 10 min Inkubation führten zum Freisetzen der Protoplasten. Myzel und Protoplasten wurden durch Zentrifugation (20 min, 1100 rpm, 4°C) getrennt. Der Überstand mit den Protoplasten wurde in ein neues Falcon-Reaktionsgefäß überführt und auf Eis aufbewahrt. Das Myzel-Pellet wurde unter leichtem Schwenken (70 rpm) in 40 ml 0,5 M MgSO₄ gelöst und die Zentrifugation ein- bis zweimal wiederholt. Bei Bedarf, wenn die Protoplasten-Lösungen viele Hyphenstücke enthielten, wurden die Überstände durch sterile Glaswolle filtriert. Die Protoplastenlösungen wurden mit 2,5 Vol kaltem 1 M Sorbitol versetzt und danach durch Zentrifugation (20 min, 1800 rpm, 4°C) pelletiert. Pelletierte Protoplasten wurden mit 1 M Sorbitol gelöst, zusammengeführt und erneut zentrifugiert. Dieser Schritt wurde so lange wiederholt bis 1 x 10⁸ /ml Protoplasten angereichert waren. Nach Zugabe von 250 µl 1 M CaCl₂-Lösung wurden die Protoplasten ÜN auf Eis inkubiert.

Für die Transformation wurden 20-40 µg DNA in 120 µl TE-Puffer mit 50 mM CaCl₂ aufgenommen, mit 200 µl Protoplasten vermischt und 30-60 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 1 Vol kaltem 44 % PEG und einer Inkubation von 5 min bei RT wurde der Ansatz gemischt und anschließend weitere 5 min auf Eis inkubiert. Zur Regeneration wurden die Protoplasten in 5 ml osmostabilisiertes Selektivmedium (rescue-Medium) überführt und ÜN bei 30°C leicht geschwenkt (50 rpm). Jeder Ansatz wurde mit 1 Vol osmostabilisiertem Weichagar (Top-Agar) des gleichen Mediums vermischt und auf zwei entsprechende Agarplatten verteilt. Die Identifizierung und Vereinzelung von Transformanten erfolgte nach 3-7 tägiger Inkubation bei 28°C.

4.2.6 Intrazelluläre cAMP Messung in *S. commune*

Die intrazelluläre cAMP-Messung erfolgte nichtradioaktiv mit dem „cAMP Direct Biotrak EIA-Kit“ von Amersham Bioscience (Freiberg) nach Angaben des Herstellers bzw. mit dem „cAMP Immunoassay Kit“ von R&D Systems GmbH (Wiesbaden-Nordenstadt). Das Test basiert darauf, dass cAMP in der Probe mit einer bestimmten Menge Peroxidase-markierten cAMP um die Bindestelle an einem polyklonalen Kaninchen-Antikörper konkurriert. Während der Inkubation bindet der Kaninchen-AK an einem Anti-Kaninchen-AK, der sich auf einer Mikrotiterplatte befindet. Durch Zugabe einer Substratlösung wird die gebundene Enzymaktivität photometrisch bei 450 nm in einem Mikrotiterplattengerät gemessen (Versa Max microplate reader, Molecular Device). Die Intensität der Farbe ist umgekehrt proportional zur Konzentration des cAMP in der Probe.

Für die Messung wurde Myzel von *S. commune* mit flüssigen Stickstoff gemörsert und 0,1 g Myzel mit 1 ml eiskalter Trichloressigsäure (5%) versetzt und gemischt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation (20 min, 13000 rpm, 4°C) und der Überstand wurde danach dreimal mit je 1 ml wassergesättigten Diethylether gewaschen. Die gereinigten Überstände wurden in einer Speedvac DNA 110 (Savant GMI Inc, Minnesota, USA) getrocknet und für den Test mit Puffer gelöst und in verschiedenen Konzentrationen in die Messung eingesetzt.

4.2.7 Bestimmung der Proteinkinase A-Aktivität

Mittels des „PepTag Assay“ (Promega, Mannheim) erfolgte die nicht-radioaktive Bestimmung der PKA-Aktivität von *S. commune* Protein-Rohextrakten. Dabei wird ein Peptid (Kemptid), das an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist und welches über die Konsensus-Sequenz der PKA-Phosphorylierungsstelle verfügt, als Phosphatgruppenakzeptor genutzt. Die Übertragung der Phosphatgruppen führt zur negativen Ladung des Peptids und damit zu einem veränderten Laufverhalten im Agarosegel.

Die Durchführung des Versuchs erfolgte nach Herstellerangaben. Protein-Rohextrakte wurden auf 2 mg/ml verdünnt. Davon kamen 10 µl in der Reaktion zum Einsatz. Die Visualisierung der fluoreszierenden Peptide im Agarosegel erfolgte durch UV-Bestrahlung. Nach anschließender Gelelution wurde die Menge an phosphoryliertem Peptid durch spektrophotomerische Messung der Fluoreszenz bei 570 nm bestimmt.

4.2.8 Indirekte Immunfluoreszenz-Färbung (nach Fischer und Timberlake, 1995; Raju, 1982)

Für mikroskopische Untersuchungen wurde *S. commune* auf Festmedien angeimpft, auf denen sich sterile Deckgläschen befanden. Nachdem Pilzmyzel über den Rand der Deckgläschen gewachsen war, wurden diese vorsichtig abgenommen und 60 min bei RT in einer Petrischale mit Fixierlösung inkubiert. Nach dreimal 5 min Waschen mit PME-Lösung wurden die Deckgläschen 20 min mit 100 µl Lysozym-Lösung überschichtet, um das Chitin in der Zellwand zu lysieren. Nach dreimal 5 min Waschen in PME-Lösung inkubierte man das Myzel 5 min bei RT in Extraktionslösung. Anschließend wurde das Deckgläschen mit dem Pilzmyzel in vorgekühltes Methanol überführt, 10 min bei -20 °C fixiert und erneut 5 min mit PME-Lösung gewaschen. Zur Blockade unspezifischer Antikörper-Bindungsstellen folgte eine 5-minütige Inkubation in TBS-Puffer mit 3 % Milchpulver (Glücksklee, Nestle und Naturaflor, Töpfer GmbH, Dietmannsried) bei RT. Das Myzel wurde danach mit dem 1. AK (α -Tubulin Maus, 1:500 in TSB mit 3 % Milchpulver) überschichtet und ÜN in einer feuchten Kammer bei 4 °C inkubiert. Nach dreimal 5 min Waschen mit TSB-Puffer wurde das Myzel mit dem 2. AK (FITC konjugierter Kaninchen-anti-Maus AK, 1:100 in TBS mit 3 % Milchpulver) überschichtet und 60 min bei RT inkubiert und anschließend dreimal 5 min in TSB-Puffer gewaschen. Zur Mikroskopie wurde das Deckgläschen mit dem Myzel mit Einbettungsmedium

versehen, das u.a. DAPI zur Zellkernfärbung (0,1–1 µg/ml) oder Calcofluor (0,1 mg/ml) zur Zellwandfärbung enthielt und auf einen Objektträger gelegt. Die Auswertung erfolgte an einem Axioplan 2-Mikroskop (Zeiss, Jena) mit dem Filter 24 (Zeiss) für FITC (Absorptionsspektrum: 440-495-540 nm) und 02 (Zeiss) für DAPI. Für die Bilddokumentation wurden die digitalen Kamera Insight Firewire 4 image sample (Diagnostic Instruments, Sterling Heights) und die Software Spot Version 4.6 (Diagnostic Instruments) verwendet.

4.2.9 Anfertigung von Mikrotomschnitten verschiedener Fruchtkörperstadien von *S. commune* (Gube, 2007)

Vor der Einbettung der Fruchtkörper erfolgte zunächst die Fixierung in Pfeiffer's Gemisch, um die Luft aus den Fruchtkörpern zu bekommen. Dafür wurde je ein Fruchtkörper in ein 2 ml Reaktionsgefäße mit Pfeiffer's Gemisch überführt und für ca. 7 Tage inkubiert, bis die Fruchtkörper in dem Gemisch untergegangen waren, d.h. die Luft entwichen war. Danach wurden die fixierten Fruchtkörper für 24 h in eine Methanol und Pfeiffer's Gemisch-Lösung (1:1) überführt und anschließend für 24 h in Methanol inkubiert. Die Fruchtkörper wurden dann für 24 h in eine Methanol und Technovit Vorbereitungslösung 7100 (Heraeus-Kulzer, Hanau) in der Mischung 1:1 überführt und anschließend für 2-3 Tage in Technovit 7100 Lösung inkubiert.

Die Einbettung der Fruchtkörper erfolgte in Einbettungsformen „S/Q“ (Heraeus-Kulzer, Hanau). Dafür wurden die Fruchtkörper mit einer Pinzette in die entsprechenden Waben der Einbettungsform verteilt und jeweils 1 ml Einbettungsmedium (Technovit 7100 mit Härter II (Heraeus-Kulzer, Hanau) im Verhältnis 12:1 zugegeben. Während der ersten 30-60 min der Aushärtung wurde mit einem Binokular Stemi 2000-C (Carl Zeiss, Jena) die richtige Lage der Fruchtkörper im Einbettungsmedium für die Schnitte überprüft und gegebenenfalls korrigiert.

Nach Aushärtung des Einbettungsmediums (ca. 1 h) wurde je eine Histoblockform auf eine gefüllte Wabe gesetzt und mit einer zähflüssigen Masse aus Technovit 3040-Pulver ((Heraeus-Kulzer) und H₂O im Verhältnis 2-3:1 randvoll befüllt. Nach Aushärtung der Masse (ca. 1 h) konnten die Histoblöcke aus ihrer Form gelöst werden.

Das Schneiden der Fruchtkörper mit einer Dicke von 8-10 μm erfolgt in einem Rotationsmikrotom Mikrom HM 355 (MICROM International GmbH, Walldorf). Die Schnitte wurden auf einen Objektträger überführt, mit Propanol fixiert und anschließend mit Toluidinblau (0,1 % in H_2O) gefärbt. Die Objekte wurden mit Merckoglas (Merck) bedeckt und danach mikroskopisch mit einem Jenalab Mikroskop (Carl Zeiss, Jena) untersucht. Die Dokumentation erfolgte mit einer Sony 3 CCD Videokamera CCD-high (Berlin) und die Bildbearbeitung mit der Software Zeiss KS199 version 3.0.

Für die Färbung der Zellkerne wurden die Mikrotomschnitte mit jeweils 10 μl DAPI-Lösung (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in Einbettungsmedium) benetzt, mit einem Deckglas eingedeckt und für 20-30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Deckglas wieder entfernt, die gebrauchte DAPI-Lösung abgetupft und mit frischer DAPI-Lösung versehen. Nach ca. 30 min erfolgte die mikroskopische Untersuchung mit einem Axioplan 2-Mikroskop (Zeiss, Jena) mit dem Filter 02 (Zeiss). Für die Bilddokumentation wurden die digitale Kamera Insight Firewire 4 image sample (Diagnostic Instruments, Sterling Heights) und die Software Spot Version 4.6 (Diagnostic Instruments) verwendet.

4.3 Weitere molekularbiologische Arbeiten

4.3.1 Restriktion von DNA

Die Restriktion von Plasmid-DNA erfolgte im 20 μl Ansatz mit 1 U Restriktionsenzym und den Reaktionspuffern nach Angaben des Herstellers. Zur Entfernung von RNA in der Probe wurde dem Ansatz RNase A (Sigma-Aldrich, Steinheim) zugesetzt. Nach einer 3-4stündigen Inkubation bei der entsprechenden Reaktionstemperatur fand die Auftrennung der DNA über Gelelektrophorese statt. Für die Restriktion genomischer DNA wurden 100 μl Ansätze mit 10 U Restriktionsenzym verwendet und ÜN inkubiert.

4.3.2 Agarose-Gelelektrophorese (Sambrook *et al.*, 1989)

DNA-Fragmenten wurden ihrer Größe nach in horizontalen Agarose-Gelen bei einer Spannung von 6,5 V/cm aufgetrennt. Die Konzentration der Agarose in 1 x TAE-Puffer variierte von 0,8 bis 2 % je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente. Als Laufpuffer diente 1 x TAE-Puffer. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit 0,1 Vol Lade-puffer versetzt. Als Größenmarker diente mit der Restriktionsendonuklease *Pst*I verdaut

DNA des Phagen *Lambda*. Das Sichtbarmachen der Nukleinsäuren erfolgte nach 10 min Färben in einer Ethidiumbromidlösung (1mg/ml) unter UV-Licht. Die Gele wurden mit dem Infinity Video-Dokumentationssystem (Vilber Lourmat, Eberhardzell) mit der Software Infinity-Capt Version 14.1a dokumentiert.

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus einem Gel wurde die gewünschte Bande unter UV-Licht ausgeschnitten und die DNA mit dem JetSorb Gel Extraction Kit (GENOMED, Bad Oyeshausen) oder QIAquick® Gel Extraktion Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers gereinigt.

4.3.3 Klonierung von DNA-Fragmenten (Dower *et al.*, 1988; Calvin und Hanawalt, 1988)

DNA-Restriktionsfragmente wurden in den mit denselben Restriktionsenzymen geschnittenen pBluescript-Vektor kloniert. Wurde nur in eine Restriktionsschnittstelle des Vektors kloniert, so dass beide Vektorenden zueinander passende Basensequenzen besaßen, mussten die Vektorenden zunächst dephosphoryliert werden, um eine Religation des Vektors zu verhindern. Dies erfolgte durch Inkubation mit alkalischer Phosphatase (Antarctic phosphatase, New England Biolabs) nach Angaben des Herstellers. Die Ligationreaktion erfolgte in einem Reaktionsvolumen von 20 µl mit einem Verhältnis von Insert zu Vektor von 3:1 und 0,1 U T4-Ligase bei 16 °C ÜN.

PCR-Fragmente wurden mittels dem QIAGEN® PCR Cloning Kit (Qiagen) in den pDrive Vektor nach Angaben des Herstellers kloniert.

4.3.4 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA-Fragmente wurde von der Firma JenaGen GmbH (Jena) durchgeführt. Die Analyse der Sequenzen erfolgte mit der Software „DNASTAR“ (Lasergene, Madison USA).

4.3.5 Polymerasekettenreaktion

4.3.5.1 Amplifizierung von DNA (Saiki *et al.*, 1987)

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten mit Hilfe spezifischer Primer erfolgte nach Angaben des Herstellers der *Taq*-Polymerase (SAWADY Taq-DNA-Polymerase, peqlab).

In einem 20 µl Ansatz wurden dabei 2 µl 5x *Taq*-Puffer, 2 µl Enhancer, 2 µl dNTPs (2mM), je 2 µl Primer (10 µM), 0,2 U *Taq*-Polymerase und 1-2 µl cDNA bzw. 2 µl Plasmid-DNA (1 pg-1 ng) oder genomische DNA (50-100 ng) vereinigt und mit sterilem *Aqua dest.* Aufgefüllt.

Die Reaktionen wurden im Thermoblock (T3 Thermocycler, Biometra) inkubiert. Nach einem Denaturierungsschritt (94 °C, 3 min) folgten in 35-39 Zyklen eine Denaturierungs- (94 °C, 30 sec), eine Annealing- (45 s) und eine Elongations-Phase (72 °C). Nach Beendigung der Zyklen erfolgte eine 5 min Elongationsphase bei 72°C. Die Elongationszeit während der Zyklen variierte abhängig von der Länge der zu amplifizierenden DNA-Sequenz, wobei von einer Polymerisationsgeschwindigkeit der *Taq*-Polymerase von 1kb/min ausgegangen wurde. Die Temperatur während der Annealingphase richtete sich nach dem GC-Gehalt der verwendeten Oligonukleotide. Sollte das PCR-Produkt anschließend mit dem QIAGEN® PCR Cloning Kit (Qiagen) kloniert werden, wurde der letzte Polymerisationsschritt zur Erhöhung der Klonierungseffizienz auf 1 h verlängert.

4.3.5.2 TAIL-PCR (Liu und Whittier, 1995)

Die „Thermal Asymmetric Interlaced“-PCR wurde für die Amplifizierung unbekannter DNA-Sequenzen genutzt, die durch bekannte DNA-Sequenzen flankiert werden. Die Amplifizierung von unbekannter DNA erfolgt durch die Nutzung von ineinander geschachtelten, sequenzspezifischen Primern gemeinsam mit kurzen willkürlichen degenerierten Primern TAIL1-TAIL6 (Yamagishi *et al.*, 2002), die eine geringere Schmelztemperatur besitzen als die sequenzspezifischen. Ein PCR-Zyklus unter wenig stringenten Bedingungen ermöglicht die Bindung der degenerierten Primer an die unbekannte Sequenz. Die Amplifizierung der unbekannten Sequenzen erfolgt nun durch abwechselnde PCR-Zyklen unter hoch stringenten Bedingungen, bei den es zur Bindung der sequenzspezifischen Primer kommt. Durch den Einsatz von ineinander geschachtelten sequenzspezifischen Primern in drei aufeinanderfolgenden PCR-Reaktionen wird die Spezifität des Produkts gesteigert. Die relevanten Fragmente wurden aus dem Gel eluiert, in den pDrive-Vektor (Qiagen) kloniert und anschließend sequenziert.

4.3.5.3 Fusions-PCR (Gola und Kothe, 2003)

Der induzierbare Promotor des Gens *cell*, welches für eine Cellobiohydrolase codiert (Weber *et al.*, 1995), wurde mittels PCR an das konstitutiv aktive *rasI* Gen ab dem Startcodon ATG fusioniert. Die Induzierung des Promotors erfolgt durch Carboxymethylcellulose im Medium, in Abwesenheit von Glukose. Der Promotor wurde mit den Primern ScCell1down und ScCell1Ras aus dem 4-40 Stamm von *S. commune* amplifiziert. ScCell1Ras besitzt einen Überhang zum 5'-Ende des *rasI* Gens. Das *rasI* wurde mit den Primern RasATG und Rasup2 amplifiziert, wobei der Primer RasATG einen Überhang zum 3'-Ende des Cell1-Promotor besitzt. In einer anschließenden PCR wurden beide PCR-Produkte in einer Fusions-PCR mit den Primern ScCell1down und Rasup2 zu einem Fragment vereinigt. Das Produkt wurde in den pDrive-Vektor kloniert und die Fusion durch Sequenzierung überprüft.

4.3.5.4 Quantitative Real-Time PCR (Wong und Medrano, 2005)

Für die Quantifizierung von Genen wurde die Methode der quantitativen Real-Time-PCR genutzt, die mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen während der PCR erfolgt. Dabei interkaliert während der PCR ein Fluoreszenzfarbstoff (SYBR Green) in die DNA. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu.

Zuerst erfolgte die Synthese von komplementärer, einzelsträngiger DNA (cDNA) aus der Gesamt-RNA. Dafür wurde zunächst die RNA-Konzentration bestimmt und auf 50 ng/μl eingestellt. Die Synthese der cDNA erfolgte mit dem „iScript™ cDNA Synthesis Kit“ (BIO-RAD, München) nach Angaben des Herstellers. Dabei wurde 2 μl einer 50 ng/μl RNA-Lösung in die Reaktion eingesetzt. Für die qRT-PCR wurden in einem 25 μl Ansatz 12,5 μl Mastemix (peqGOLD Hot Start Mix Real-Time, peqlab), je 1 μl Primer (10 μM), 2 μl cDNA und 1 μl SYBR Green I (10.000x Konzentrat, Invitrogen) vereinigt und mit sterilem *Aqua dest.* aufgefüllt. Die Reaktion fand in einem Smart Cycler (Cepheid, Sunnyval, USA) statt.

Die Untersuchung der Expression von *rasI* erfolgte mit den Primerpaar ras- und ras-2. Die Expressionsuntersuchung des Gens *tpk* wurden mit den Primerpaar tpk-1 und tpk-2 durchgeführt. Für die Untersuchung der Expression der Referenzgene wurden folgende Primerpaare verwendet: tef-1 und tef-1 für *tef1* und 28S-1 und 28S-2 für 28S.

4.3.6 DNA-Hybridisierung

4.3.6.1 Herstellung markierter DNA-Sonden

Mit Digoxigenin markierte Sonden wurden nach dem Protokoll „DIG-System für Filterhybridisierung“ (Boehringer, Mannheim) hergestellt. Dabei wurde die DNA zunächst 10 min bei 95°C denaturiert und auf Eis gestellt. Zu 15 µl DNA (10 ng-3 µg) wurden 2 µl Hexanukleotid-Mix (10x), 2 µl DIG-Labeling-Mix (10x) und 1 µl Klenow Enzym (2 U/µl) zugegeben und 20 h bei 37°C inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen, wurde dem Ansatz 2 µl EDTA (0,2 M, pH 8,0) zugefügt. Die Sonde wurde für die Hybridisierung in DIG-Standardhybridisierungspuffer aufgenommen (1:2000).

4.3.6.2 Southern-Hybridisierung (Southern, 1975; Sambrook *et al.*, 1989)

Die Agarosegele mit der elektrophoretisch aufgetrennten DNA wurden je 30 min in Denaturierungslösung und anschließend in Neutralisierungslösung geschwenkt. Danach wurde das Gel in 20 x SSC abgespült die DNA mittels eines abwärtsgerichteten Brückentransferblots in 20 x SSC auf eine amphoterische Nylonmembran (Porablot NY amp, Macherey-Nagel, Düren) übertragen. Durch Backen bei 120°C für 30 min wurde die DNA kovalent an die Membran gebunden. Zur Absättigung unspezifischer Nukleinsäure-Bindestellen erfolgte eine Vorhybridisierung der Membran für mindestens 2 h bei der gewünschten Temperatur (55-68°C) im DIG-Standard-Hybridisierungspuffer (20 ml/100 cm² Membranfläche). Die Hybridisierung mit der denaturierten Sonde (95°C, 10 min) in Standard-Hybridisierungspuffer erfolgte ÜN. Durch Waschen der Membran für zweimal 5 min mit 2 x Wash (RT) und zweimal 15 min mit 0,5 x Wash (55-68°C) wurde die unspezifisch gebundene Sonde entfernt. Anschließend wurde die Membran für 2 min bei RT in Maleinsäurepuffer mit 0,3 % Tween 20 gewaschen. Unspezifische Antikörperbindestellen wurden durch Inkubation für mindestens 30 min bei RT mit Blocking-Reagenz (1% Blocking-Reagenz in Maleinsäurepuffer) abgesättigt. Danach wurde die Membran mit an Alkalische Phosphatase gekoppelten Anti-Digoxigenin-Antikörper für 30 min bei RT behandelt. Durch Waschen der Membran für 2 x 15 min in Maleinsäurepuffer mit 0,3 % Tween 20 wurden die ungebundenen Antikörper entfernt. Anschließend wurde die Membran für 3 min bei RT mit Detektionspuffer behandelt und dann 5 min mit dem Substrat CSP-Star (Roche Diagnostics, Mannheim) inkubiert. Die Chemilumineszenz

konnte innerhalb von 10 min durch Exposition der Membran auf einem Film Pierce CL-XPosure (perbio science, Bonn) detektiert werden.

4.3.6.3 Kolonie-Hybridisierung

Die Koloniehybridisierung diente der Identifizierung gewünschter rekombinanter Klone aus einer Vielzahl von *E.coli*-Klonen. Die Bakterienkolonien wurden mittels sterilem Zahnstocher auf Selektivmedien mit einem 100er Raster übertragen und ÜN bei 37 °C inkubiert. Die Agarplatten mit den Kolonien wurden vor der Übertragung auf eine Nylonmembran für 30 min bei 4°C gekühlt. Die Übertragung erfolgte durch Auflegen der Membran (Porablot NY amp) im Format 6 x 6 cm für eine Minute, wobei die Orientierung der Filter markiert wurde. Anschließend wurden die Kolonien 15 min denaturiert, 15 min neutralisiert und mit 2 x SSC für 10 min behandelt, indem die Filter auf mit den entsprechenden Lösungen getränktes Whatman Papier gelegt wurden. Die kovalente Bindung an die Membran erfolgte durch Backen für mindestens 30 min bei 80°C. Die anschließenden Schritte waren mit denen der Southern-Hybridisierung identisch.

4.3.7 *In vitro* Mutagenese mittels PCR

Zur gezielten Einführung von Mutationen in DNA-Fragmente mittels PCR-Amplifikation wurde das „QuickChange® Site-Directed Mutagenesis Kit“ (Stratagene, Groningen, NL) verwendet, welches die Mutagenese in doppelsträngiger Plasmid-DNA ermöglichte. Für die Herstellung des Plasmids pRasG12V wurden die Primer G12V-1 und G12V-2, für das Plasmid pRASG15N die Primer G12N-1 und G15N-2 und für die Synthese des Plasmids pRasQ61L die Primer Q61L-1 und Q61L-2 verwendet.

5. Ergebnisse

5.1 Untersuchung von *ras1* aus *S. commune*

Das membrangebundene G-Protein Ras1 besitzt eine zentrale Funktion in der Weiterleitung von Signalen innerhalb der Zelle. Ras1 ist ein molekularer Schalter, dessen Aktivität durch Guanosinnukleotidaustauschfaktoren (GEFs) und GTPase aktivierende Proteine (GAPs) reguliert wird. Nur wenig Gene aus *S. commune* sind bekannt, die für Proteine in Signaltransduktionskaskaden kodieren. Um die Rolle von Ras1 in der Entwicklung von *S. commune* zu untersuchen, wurde das Gen für Ras identifiziert und charakterisiert. Durch Mutationen in der GTP-Binderegion von Ras1 wurden konstitutiv aktive *ras1*-Allele erzeugt. Die Phänotypen der Transformanten wurden im Vergleich zu anderen Signaltransduktionsmutanten charakterisiert.

5.1.1 Isolierung und Charakterisierung von *ras1* aus *S. commune*

Aus einer Untersuchung spezifisch exprimierter Gene war eine partielle cDNA Sequenz für *ras1* bekannt. Ausgehend von dieser bekannten cDNA-Sequenz von *ras1* sollte die komplette genomische Sequenz isoliert werden. Durch PCR mit den Primern Rasdown1 und Rasup2 konnte ein 1,06 kb großes genomisches Fragment aus dem *S. commune* Stamm 4-40 amplifiziert werden. Dieses Fragment wurde in den pDrive-Vektor kloniert und anschließend sequenziert. Das Fragment enthielt den gesamten ORF des *ras1*-Gens. Zur Bestimmung der Introns wurde die genomische Sequenz mit der cDNA-Sequenz (Genbank-Zugriffsnummer: AAF73473) verglichen. Mit Ausnahme der Introns ist die cDNA zu 100 % identisch mit der genomischen Sequenz. Das *ras1*-Gen besitzt eine Länge von 834 bp mit einem ORF von 576 bp. Dieser wird durch vier Introns, welche 48, 113, 47 und 49 bp lang sind, unterbrochen. Das davon abgeleitete Protein setzt sich aus 191 Aminosäure-Resten zusammen, was eine kalkulierte molekulare Masse von 21,7 kDa ergibt. Zusätzlich enthält das Fragment einen 5'-nicht translatierten Bereich von 118 bp und einen 3'-nicht translatierten Bereich von 111 bp. Ein weiteres Intron, mit der Länge von 48 bp, befindet sich vor dem Translationsstartpunkt. Durch TAIL-PCR mit den sequenzspezifischen Primern RasPromup und Rasup1 konnten zusätzlich 840 bp im 5'-Bereich amplifiziert werden. Die vollständige Struktur des Gens *ras1* aus *S. commune* ist in Abb. 5.1 dargestellt.

CAGGCAAGGTGTGCAATGATTTCCTTCG TGATG TCGACAGTGA CTGCCCTGNCGGGGAACCTCC TACAGACGCG ACAACA	80
TATCCTGGCAGAAATGCCACAATACGAG GAGC ACCGCT ACCTA CTCCGCGACGTATCCCGCGGCTCTCGCTCC CAGTTC	160
TATTGGGAACGAAGAAGGGGATTACAGC CCTCACGGAAATTCAT AGCGGCGTCCGGCGCATTCACCAAAACCGGT GCACCC	240
CGTGCACCTCCATCAC TCCC TACC TGGG AGCAGGAACCCGAGG TACGACAGGAC GACGAGAACGACGAGGATGG ATAGGA	320
GGCCCGGCAGCCCAACCCGTCGCTTAGG TACCTTTCCTCCGTCC CTTATCACCTTTTCTTGTTGTTT GCGATACCCCG	400
AGACACACGACACACGCACAAAGTGCTT TTACC TAT TATATCA CCATTTAGCTCAACCACAGTATCGCGACGGA CAGCAG	480
TACGAGCAGCAGCCTCGGACTTG TAGA TTATTACCACGGGTA TCGAAGGGCCC TGCCGGGCTCCGGA TGGAGGGAGT	560
ACTGGCGGAGGACCGCTCTTAGCTTCA CCTTAGCTTG TAGCGGTATAGAAAGTGCAGAGTTAAAAA AAAAAA	640
AAAAAAGAAAA TCATGCAGCGGCTGGGAAAGTGGGACGGCAACACATGCTGCA TGTGCCTTCATTTCTCCCTCACC T	720
CATCCATCCGCTGCGCTGTCGCAAACTCGACGCGGAC TCGACTGCTGCTCATCGCCATTACGACCCGCACGACAA	800
ACCGGCGGCGCAACGCACGCTATTACGACCGACCGCATCGACCGCAGCCCCCTCTTCTCTCCACACGCTCTTCGTTT	880
ACGATTACCGGCTCTCCCCCTCTTGAGgtccgcgacgagc tcgc ccgtgcac tcacgacgctcacgcc tcgcagATATG	960
M	
GACAAC TGGAGAG TTGCAGTACTAGGCGATGGTGGGGTGGGCAAAACC GCTCTCGCAGTCCAGgtcagtcgcgcgtccc	1040
D N W R V A V L G D G G V G K T A L A V Q	
gagtcgtctgctcgcgcgtgatctcacgc cagTTTACGC TAAAT TGCTTCGTTggtaagcggcctcctcc tcagacggcg t	1120
F T L N C F V	
catggcgcgtgacccgcgcccgctcttcttcgccccacagaggtccgtctgc ttcgggtctgcgcccgcacgtctgac	1200
atctccagacttatgatcccaaatcgaggacgcgta tcgcaagcagc tagtggttgacaataaaatgtgcttcgttggga	1280
GGTCATAGACACTGCCGGACAGgggtgcgtgcttgcaacccgcacctcgac gcttactcacccca ttccaGAGGAGTACGC	1360
V I D T A G Q	E E Y A
GACGCTTCGCGATCAGTG GGTACGgtgcgtaccacgacgccgcgcccaac catacccccactcatctcccacagagagggc	1440
T L R D Q W V	
CAAGGTTCATCCTTG TG TACTCCATAGCATCCCGCTCCACATTCGACC GGC TGGAGGCTTCC GGCAA TCGATCGGCG	1520
Q G F I L V Y S I A S R S T F D R L E V F R Q S M R R	
CGTGAAGCAGGGCGACCC CATATTTATGCTCGTGGGGAACAAGTGCAC AAGACCTACGAGCGG GAAGTGTCAAAGGAGG	1600
V K R G D P I F M L V G N K C D K T Y E R E V S K E	
AGGGAGCGCAGCTCGCCA GACAGTTTGGCTGCGAGTTCATCGAGACGTC GGC AAAGACC GCCCA GAACGTCGAGCGATTA	1680
E G A Q L A R Q F G C E F I E T S A K T A Q N V E R L	
TTCACGACACTCGTCCGC GCATTACGACAGACGAAACAAATAGAGGCGG GACCGGGCGGTGGTC CAACC AAGCCGAAAGA	1760
F T T L V R A L R Q T K Q I E A G P G G G P T K P K E	
AAAGGAGAAGAGGAAGTG TATTATCATGtaggggaattcttaatgggat ttactggcgttatagattccctccccattt	1840
K E K R K C I I M	
acctcatttgatgatacc acggcctgcgcttcgtttctgcctcgctgtcttgc ttcaga	1902

Abb. 5.1: Struktur des Gens *ras1* aus *S. commune* 4-40

Die Sequenz des 1902 bp großen Fragments enthielt *ras1*. Die Aminosäuresequenz des offenen Leserahmens ist unter der DNA-Sequenz im Ein-Buchstabencode angegeben. Die Introns sind durch klein gedruckte Basen gekennzeichnet. Mögliche Promotorelemente sind unterstrichen. Die funktionell konservierten Bereiche GXGXXG, DXXG, NKCD und CaaX sind fett gedruckt.

Der 5'-Bereich von 956 bp enthält vermutlich den gesamten Promotorbereich. Eine TATA-Box, ein klassisches Promotorelement, ist nicht zu erkennen. Dieses Element erleichtert, in Zusammenarbeit mit entsprechenden Transkriptionsfaktoren, das Aufschmelzen der DNA-Doppelhelix, und ermöglicht so die Transkriptionsinitiation. Die Lage der TATA-Box in

Eukaryoten ist um etwa -30 (Juo *et al.*, 1996), bei Pilzen auch -60 bis -120 (Moore und Frazer, 2002), in Prokaryoten etwa um die Position -10 (Busby und Ebright, 1994). Im Bereich der TATA-Box kann in *ras1* um die Position -47 vor dem Transkriptionsstartpunkt eine AT-reiche Region erkannt werden (ATTT), die eventuell eine ähnliche Funktion übernehmen kann. Ein weiteres mögliches Promotorelement die stromaufwärtsliegende CAAT-Box (Moore und Frazer, 2002) und eine das Startcodon umgebene Kozak-Sequenz (CCA/GCCAUTG, Kozak, 1984) sind nicht zu finden.

Der 3'-Bereich des Gens ist 111 bp lang. Ein für Eukaryoten typisches Polyadenylierungssignal (AAUAAA, Wahle, 1992) ist in diesem Bereich nicht zu erkennen.

Die abgeleitete Aminosäuresequenz von Ras1 zeigt 88 % Identität zu einem Ras1-Homolog von *Laccaria bicolor* (Genbank-Zugriffsnummer: AADO1987), 82 % Identität zu Ras2 von *Suillus bovinus* (AAF65466), 80 % zu Ras1 aus *Coprinopsis cinerea* (BAA02552) und 63 % Identität zu Ras2 von *Ustilago maydis* (AA019639.1).

Im Sequenzvergleich von Ras1 aus *S. commune* mit verschiedenen Basidiomyceten kann man wichtige funktionelle Domänen der Ras Super-Familie erkennen (Abb. 5.2). Das Motiv GXGXXG im N-Terminus ist bedeutend für die GTP-Bindung, ebenso das DXXG- und das NKXD-Motiv (Lowy, 1993). Die „switch“-Regionen I und II verändern ihre Konformation während der GTP-Bindung (Sprang, 1997). Die „switch I“-Region wird auch als Effektor-Region bezeichnet.

Am C-Terminus befindet sich das CaaX-Motiv (C = Cystein, a = aliphatische Aminosäure, X = beliebige Aminosäure), welches für die Lokalisierung in der Plasmamembran verantwortlich ist (Lowy, 1993). Die Membranlokalisierung benötigt verschiedene posttranslationale Modifizierungen des CaaX-Motivs. Diese umfasst die Farnesylierung des Cysteins, die Abspaltung von -aaX und anschließender Carboxymethylierung und Palmitoylierung.

1	M A A R A Q	FLREYKLVVV	G G G V G	K S A L T I Q F I Q S H F V D E Y D	C. cinerea Ras
1	M A S K -	FLREYKLVVV	G G G G E G K S	C L T I Q F I Q S H F V D E Y D	L. bicolor Ras
1	M A G S T T	FLREYKLVVV	G G G V G	K S A L T I Q F I Q S H F V D E Y D	L. edodes Ras
1	M S - K A Q	FLREYKLVVV	G G G V G	K S A L T I Q F I Q S H F V D E Y D	C. neoformans Ras1
1	M D N - - - - -	W R V A V L G	D G G V G	K T A L A V Q F T L N C F V E T Y D	S. commune Ras1
1	- - - - -	- V A V L G	D G G V G	K T A L A V Q F T L N C F V E T Y D	S. bovinus Ras2
1	M S - R A Q	FLREYKLVVV	G G G V G	K S A L T I Q F I Q S H F V D E Y D	S. bovinus Ras1
1	M S G K - - - M M I	Y K L V V L G	D G G V G	K T A L T I Q L C L N H F V E T Y D	U. maydis Ras2
41	P T I E D S Y R K Q C	I I D D E V A L L D V L	D T A G Q	- - - E E Y G A M R E Q	C. cinerea Ras
39	P T I E E S Y R K Q C	V I D D E V A L L D V L	D T A G Q	- - - E E Y S A M R E Q	L. bicolor Ras
41	P T I E D S Y R K Q C	V I D D E V A L L D V L	D T A G Q	- - - E E Y G A M R E Q	L. edodes Ras
40	P T I E D S Y R K Q C	I I D E E V A L L D V L	D T A G Q	- - - E E Y G A M R E Q	C. neoformans Ras1
34	P T I E D A Y R K Q L	V D N K M C F V E V I	D T A G Q	- - - E E Y A T L R D Q	S. commune Ras1
29	P T I E D A Y R K Q L	V D N K M C F V E V I	D T A G Q	- - - E E Y A T L R D Q	S. bovinus Ras2
40	P T I E D S Y P K Q C	V I D D E V A L L D V L	D T A G Q	- - - E E Y G A M R E Q	S. bovinus Ras1
38	P T I E D S Y R K Q T	V I D D Q P C M L E V L	D T A G Q	D G Q E E Y T A L R D Q	U. maydis Ras2
78	Y M R T G E G F L L V Y S I T S R N	S F E E I S I F H Q Q I L R V K D Q D S F	-	-	C. cinerea Ras
76	Y M R T G E G F L L V Y S I T S R Q	S F E E I S T F H Q Q I L R V K D K D Y F	-	-	L. bicolor Ras
78	Y M R T G E G F L L V Y S I T S R N	S F E E I S T F H Q Q I L R V K D Q D T F	-	-	L. edodes Ras
77	Y M R T G E G F L L V Y S I T S R S	S F E E V S T F H Q Q I L R V K D K D Y F	-	-	C. neoformans Ras1
71	W V R E G Q G F I L V Y S I A S R S	T F D R L E V F R Q S M R V K R G D P I	-	-	S. commune Ras1
66	W V R E G Q G F I L V Y S I A S R S	T F E E R L D V F R Q S M L K V K R Q K P I	-	-	S. bovinus Ras2
77	Y M R T G E G F L L V Y S I T S R D	S F E E I S T F H Q Q I L R V K D Q D S F	-	-	S. bovinus Ras1
78	W I R E G E G F L L V Y S I S A R A	T E E R V E R F E R S Q L S R V K D Q E P H T	-	-	U. maydis Ras2
117	- P V L V V A N K C D	L E Y E R Q V G M N E G R D L A K H F G C K F I E T S A K	-	-	C. cinerea Ras
115	- P I L V V G N K C D	L D K E R V V S K Q E G E S L A R Q F G C K F I E T S A K	-	-	L. bicolor Ras
117	- P V L V V A N K C D	L E Y E R Q V G M N E G R D L A R H F G C K F I E T S A K	-	-	L. edodes Ras
116	- P V L V V A N K C D	L E Y E R Q V O P H E G R D L A K R F N A Q C I E T S A K	-	-	C. neoformans Ras1
110	- - F M L V G N K C D	K T Y E R E V S K E E G A Q L A R Q F G C E F I E T S A K	-	-	S. commune Ras1
105	- - F M L V G N K C D	K T Y E R E V S R E E G I A L A R S F G C E F M E T S A R	-	-	S. bovinus Ras2
116	- P V L V V A N K C D	L E Y E R Q V G M N E G R D L A K H F G C K F I E T S A K	-	-	S. bovinus Ras1
118	V P I M E V G N K C D	K V N E R E V S R E E G Q A L A H R L G C K F I E S S A K	-	-	U. maydis Ras2
156	Q R I N V D E A F S N	L V R E I R K Y N R E Q Q T - G R P A I A A G G G G P A G	-	-	C. cinerea Ras
154	S R I N V E N A F Y D	L V R E I R Y N K E M S N P S - - - - G F G G A R A P D	-	-	L. bicolor Ras
156	V R I N V D O A F Q D	L V R E I R K Y N K E Q Q T T G R M M T G G G G G G P P G	-	-	L. edodes Ras
155	Q R V N V D E A F I A	V V R A I R Y Q K A V N A P T K S Q T G A V G G R A A -	-	-	C. neoformans Ras1
148	T A Q N V E R L P T	T L V R A L R Q - T K Q I E A - - - - - G G C G C	-	-	S. commune Ras1
143	T A Y N V E L L F T N	L V R A L R Q - T K R L E T - - - - - G G S G G	-	-	S. bovinus Ras2
155	Q R I N V D E A F S N	L V R E I R K Y N K E Q Q T - G R P V M A N S G G G G P G	-	-	S. bovinus Ras1
158	T C V N V E R A Y Y T V	V R M I R E - Q R E - - - - - - - - - - G	-	-	U. maydis Ras2
195	S Y T Q - -	D R H H D E A P G C C A G C V T A	-	-	C. cinerea Ras
189	- - S K M D V S E P G E S A G C C G K C L V M	-	-	-	L. bicolor Ras
196	T Y A G K -	D E N D E G A G G C C G G C V V L	-	-	L. edodes Ras
194	- - - - -	E K D D H V D K G C C R G C V V L	-	-	C. neoformans Ras1
177	P T K P K E - - - -	K E K - - - R K C L T M	-	-	S. commune Ras1
172	K O S D K Q P K D G G S K K - - -	P K C V V M	-	-	S. bovinus Ras2
194	V Y S S K G D A H E G D H G G C S G C V V V	-	-	-	S. bovinus Ras1
180	T V T H K K E K - - - -	K K - - - S K C N I L	-	-	U. maydis Ras2

Abb. 5.2: Sequenzvergleich von Ras1 aus *S. commune* mit homologen Ras-Proteinen verschiedener Basidiomyceten

Verglichen wurden die Ras-Proteine von *Coprinopsis cinerea* (BAA02552), *Laccaria bicolor* (AAD01987), *Lentinula edodes* (P28775), *Cryptococcus neoformans* Ras1 (AAD55937), *Suillus bovinus* Ras1 (AAF65465), *Suillus bovinus* Ras2 (AAF65466) und *Ustilago maydis* Ras2 (AAN37908.1). Der Sequenzvergleich wurde mit dem Programm MegAlign durchgeführt. Identische Aminosäuren wurden schwarz markiert. Besonders gekennzeichnet (Box) sind die funktionellen Domänen GXGXXG, DXXG, NKXD und CaaX.

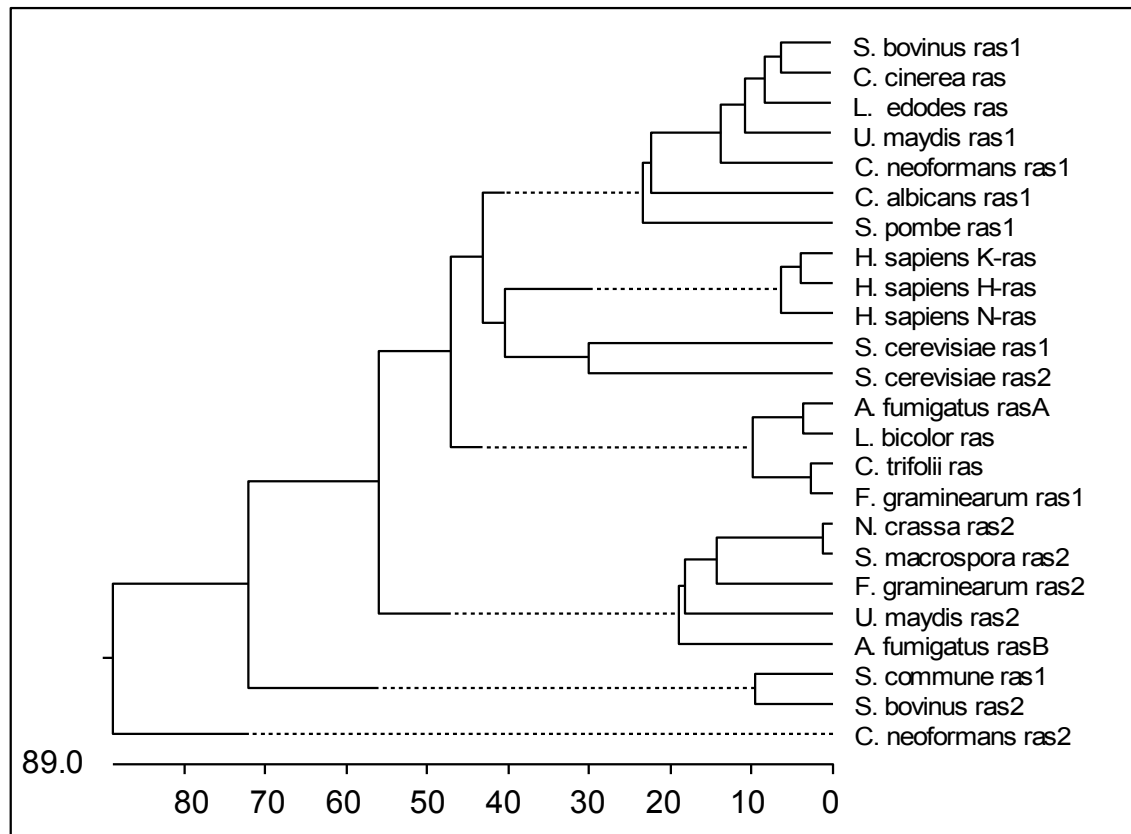


Abb. 5.3: Phylogenetischer Stammbaum verschiedener Ras-Proteine

Verglichen wurden Ras-Proteine der Pilze *Coprinopsis cinerea* (Genbank-Zugriffsnummer: BAA02552), *Suillus bovinus* (Ras1: AAF65465, Ras2: AAF65466), *Lentinula edodes* (P28775), *Ustilago maydis* (Ras1: AA019639.1, Ras2: AAN37908.1), *Cryptococcus neoformans* (Ras1: AAD55937, Ras2: AAG10598), *Candida albicans* (AAD52662), *Saccharomyces cerevisiae* (Ras1: AAA34958.1, Ras2: CAA95974.1), *Aspergillus fumigatus* (RasA: XP753526.1, RasB: XP755112), *Laccaria bicolor* (AADO1987), *Colletotrichum trifolii* (AAC03781), *Fusarium graminearum* (Ras1: XP389954, Ras2: XP390290), *Neurospora crassa* (CAC28712) und *Sordaria macrospora* (CAE00821.1) mit den drei Ras-Proteinen des Menschen (H-Ras: CAG47067, K-Ras: AAA35690, N-Ras: AAB29639). Verwendet wurde das Programm MegAlign (DNASTAR; Lasergene, Madison USA). Es wurde keine Bootstrap-Analyse durchgeführt. Der dargestellte Baum soll lediglich die verschiedenen Gruppen von Ras und ihre jeweilige Anzahl pro Organismus darstellen. Die gepunkteten Linien zeigen Diskrepanzen zwischen der Länge der Äste und den Sequenzunterschieden an. Die Skala unter dem Baum misst die Distanzen zwischen den Sequenzen

Ras1 aus *S. commune* zeigt größere Ähnlichkeit zu Ras2- bzw. RasB-Proteinen von *S. bovinus*, *N. crassa*, *S. macrospora*, *F. graminearum*, *U. maydis*, *C. neoformans* und *A. fumigatus* als zu Ras1- bzw. RasA-Proteinen, obwohl ein typisches Insert von 20 AS, wie bei *N. crassa* (Ras2) und *A. fumigatus* (RasB) beschrieben (Fortwendel *et al.*, 2004) nicht vorhanden ist (Abb. 5.3).

5.1.2 Kopienzahl und Suche nach möglichen orthologen Genen

Mit der Southern-Hybridisierung wurde überprüft, ob das Gen *ras1* im Wildtyp in mehreren Kopien im Genom von *S. commune* vorliegt. Dazu wurde chromosomale DNA mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen geschnitten, in zwei Agarosegelen aufgetrennt und die DNA auf eine Nylonmembran übertragen. Anschließend wurden die Membranen unter unterschiedlich stringenten Bedingungen mit einer *ras1*-Sonde hybridisiert. In Abb. 5.4 erkennt man, dass das Bandenmuster unter gering stringenten Bedingungen (55°C) denen unter stringenten Bedingungen behandelten Southernblot (68°C) gleicht. Dies lässt vermuten, dass *ras1* nur in einer Kopie im Genom von *S. commune* vorliegt bzw., dass keine weiteren Orthologen mit ausreichender Sequenzidentität zum Nachweis durch DNA-DNA-Hybridisierung vorliegen.

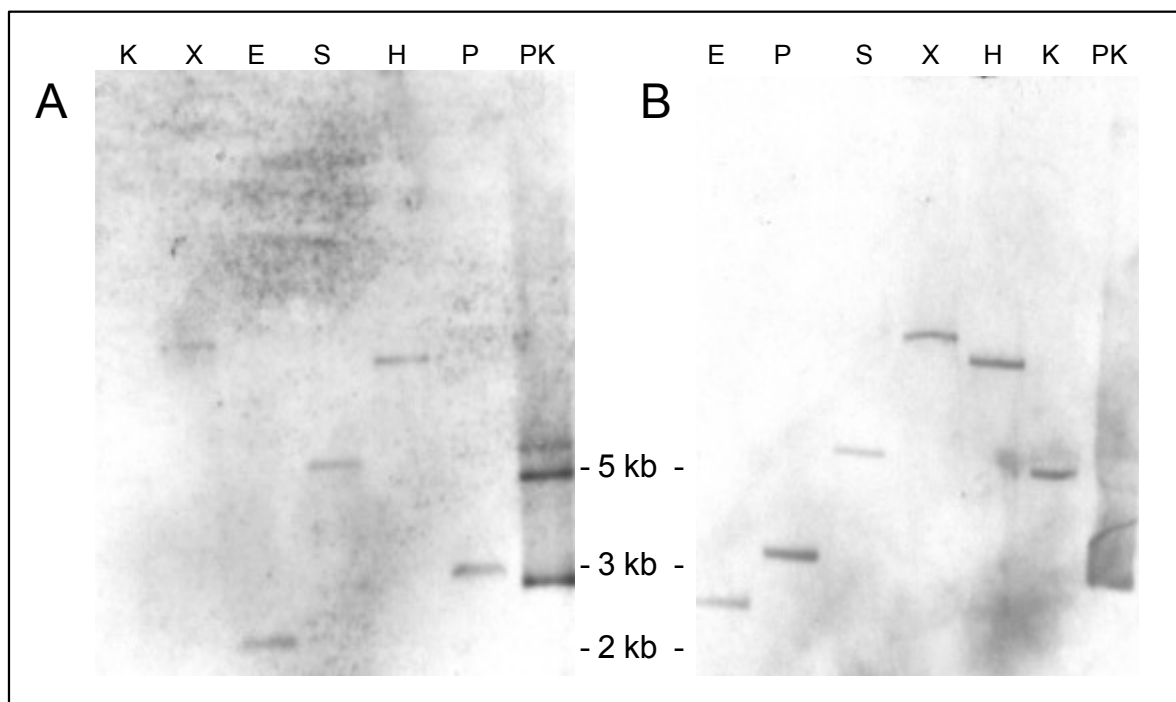


Abb. 5.4 Southern-Blot-Analyse zur Bestimmung der Kopienzahl

Chromosomale DNA aus *S. commune* wurde mit unterschiedlichen Restriktionsendonucleasen behandelt. Die auf Membranen übertragene DNA wurde bei unterschiedlich stringenten Bedingungen mit einer *ras1*-Sonde hybridisiert. A) Southernblot bei 68°C, B) Southernblot bei 55°C, K = *KpnI*, X = *XbaI*, E = *EcoRI*, S = *SacI*, H = *HindIII*, P = *PstI*, PK = Kontrolle

5.2. Erzeugung von Ras1-Mutanten in *S. commune*

Wie oben erwähnt, liegt *ras1* in *S. commune* nur als eine Kopie im Genom vor. Da es sich vermutlich um ein essentielles Gen handelt, würde die Deletion von *ras1* letal sein. Um die Funktion von Ras1 auf den Phänotyp von *S. commune* zu untersuchen, wurden Mutationen in der GTP-Binderegion eingefügt, die dazu führten, dass Ras1 entweder konstitutiv aktiv (GTP-gebunden) oder dominant negativ (GDP-gebunden) war.

5.2.1 Homologer Promotor

Um Mutationen mit dem QuickChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) in der Sequenz von *ras1* einzufügen, wurde zunächst ein Ausgangsplasmid pRaswt geschaffen (Abb. 5.5). Dazu wurde genomische DNA aus *S. commune* 4-40 mit den Primern Rasup2 und RasPromdown amplifiziert. Das Produkt von 1,3 kb enthielt das vollständige *ras1*-Gen mit 378 bp vor dem ATG-Startcodon. Durch Sequenzanalyse des Promotors wurde bestätigt, dass dieser Bereich vermutlich vollständig ist, obwohl nicht alle typischen Promotorelemente gefunden wurden. Das Fragment wurde in den pDrive Vektor kloniert und das erhaltene Plasmid pRaswt für nachfolgende Mutagenesen weiterverwendet.

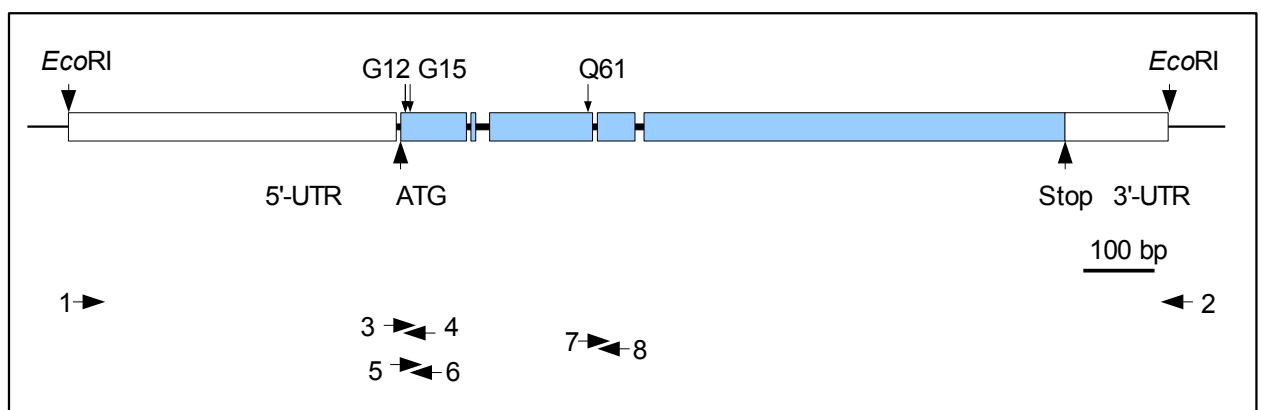


Abb. 5.5: pRaswt Plasmid

Dargestellt ist die Struktur des Plasmids pRaswt. Weiße Rechtecke sind die nicht translatierenden 5'- und 3'-Bereiche und blau unterlegte Rechtecke stellen den ORF von Ras1 dar. Waagerechte Pfeile sind die Primerbindestellen. 1 = RasPromdown, 2 = Rasup2. Austausch der Aminosäuren G12V mit dem Primerpaar G12V-1 (3) + G12V-2 (4), G15N mit dem Primerpaar G15N-1 (5) + G15N-2 (6) und Q61L mit dem Primerpaar Q61L-1 (7) + Q61L-2 (8).

Zur Herstellung von verschiedenen *ras1*-Mutanten wurde je ein Nukleotidaustausch vorgenommen. Zwei Oligonukleotidprimer, jeder komplementär zu einem der Doppelstränge des Plasmidvektors pRaswt tragen zentral die zu ersetzende Nukleotidsequenz (Abb. 5.5). Durch Amplifizierung mit der korrekturfähigen PfuTurbo-DNA-Polymerase wurde ein neuer Doppelstrang synthetisiert, der mittels der Restriktionsendonuklease *DpnI* vom Elternstrang abgespalten wurde. Anschließend erfolgte die Transformation der dsDNA mit einem Einzelstrangbruch in *E. coli* DH5 α , der die Bruchstelle repariert. Die Kontrolle der Mutagenese erfolgte mittels Sequenzierung. Das erhaltene Plasmid pRasG12V besitzt das konstitutiv aktive *ras1* Gen mit gegen Valin ausgetauschter Aminosäure Glycin an Position 12. Das Plasmid pRasQ61L trägt als Insert das konstitutiv aktive *ras1* Gen mit der gegen Lysin ausgetauschten Aminosäure Glutamin an Position 61. Durch den Aminosäure-Austausch Glycin gegen Asparagin an Position 15 erhielt man das Plasmid pRasG15N, dass ein dominant negatives *ras1*-Gen enthält.

Die durch *in vitro*-Mutagenese veränderten *ras1*-Sequenzen, ebenso das Wildtyp-Gen, wurden zur besseren Selektion nach der Transformation in zwei verschiedene Selektionsplasmide *ptrp* und *pCHI* umklontiert (Abb. 5.6). Dafür wurden die Inserts mit *EcoRI* aus den pDrive Vektor ausgeschnitten und in die mit *EcoRI* geöffneten Plasmide kloniert. Die erhaltenen Plasmide waren: Raswt/*ptrp*, RasG12V/*ptrp*, RasQ61L/*ptrp*, RasG15N/*ptrp*, Raswt/*pCHI*, RasG12V/*pCHI*, RasQ61L/*pCHI* und RasG15N/*pCHI*.

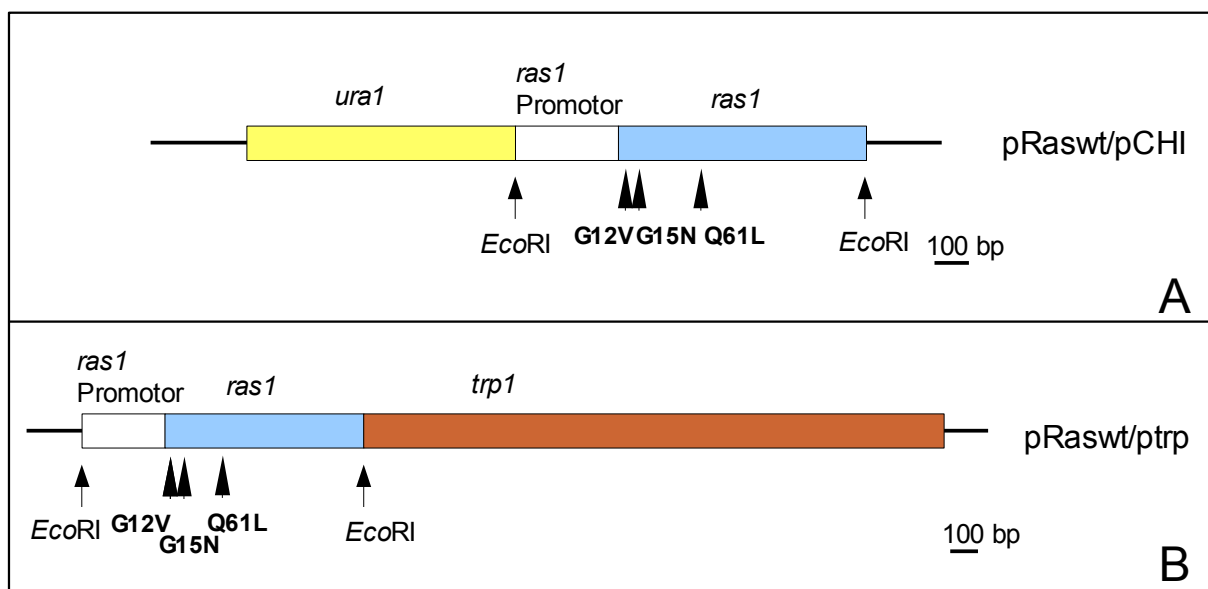


Abb. 5.6: Konstrukte für die Transformation

Dargestellt sind die Konstrukte *ras1* im Vektor *pCHI* (A) und *ras1* im Vektor *ptrp* (B). Die Stellen der jeweiligen Modifizierung im Gen sind durch Pfeile gekennzeichnet.

5.2.2 Induzierbarer Promotor

Zur Erzeugung der Plasmide pCelRaswt, pCelRasG12V und pCelRasQ61L mit konstitutiv aktiven *ras1* unter der Kontrolle des induzierbaren Promotor des *cel1*-Gens, wurde eine Fusions-PCR durchgeführt. Dafür wurde der *cel1*-Promotor mit einem Überhang zum *ras1*-Gen mit den Primern ScCell1down und ScCell1Ras amplifiziert. Mit den Primern RasATG und Rasup2 wurde in drei verschiedenen PCR-Reaktionen raswt, rasG12V und rasQ61L mit einem Überhang zum *cel1* Promotor amplifiziert. Das Promotorfragment und das entsprechende *ras1*-Produkt wurden anschließend in einer PCR mit den Primern ScCell1down und Rasup2 fusioniert. Das Produkt wurde in den pDrive Vektor kloniert. Die Überprüfung der Fusion erfolgte durch Sequenzierung.

Für die Transformation wurden die Fusionsprodukte anschließend in das Selektionsplasmid pCHI umklontiert (Abb. 5.7). Die erhaltenen Plasmide waren: CelRaswt/pCHI, CelRasG12V/pCHI, CelRasG15N/pCHI und CelRasQ61L/pCHI .

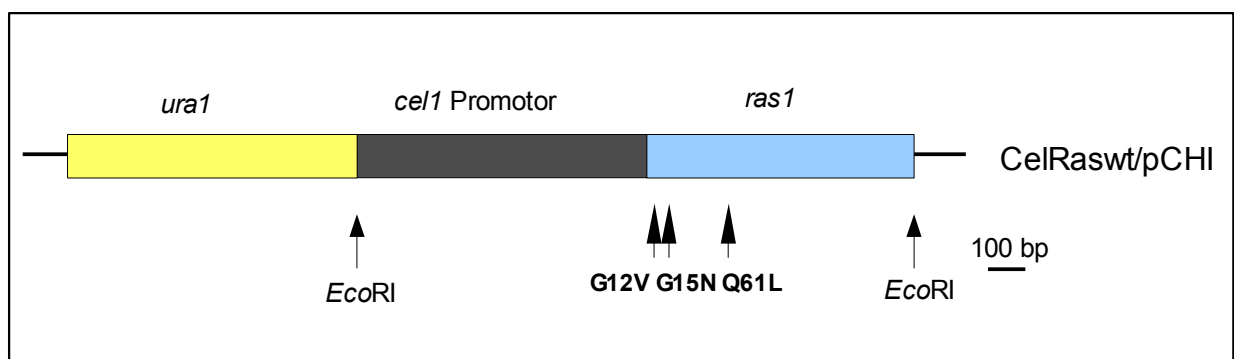


Abb. 5.7: Konstrukt von *ras1* unter dem induzierbaren Promotor *cel1*

Das Fragment wurde über *EcoRI*-Schnittstellen in den Vektor pCHI kloniert. Die Stellen der jeweiligen Modifizierung im Gen sind durch Pfeile gekennzeichnet.

5.3. Charakterisierung der konstitutiv aktiven Mutanten

5.3.1 Erzeugung der konstitutiv aktiven Mutanten T2^{G12V}, II-1^{Q61L}, II-1^{G12V} und Cel1T62^{G12V}

Die Transformation der Plasmide pRaswt, pRasG12V, pRasG15N und pRasQ61L erfolgte ektopisch zusammen mit dem Selektionsplasmid ptrp in den Stamm T2. Von den ca. 100 Transformanten zeigte nur eine Transformante einen auffälligen Phänotyp. Die Transformante T2^{G12V} zeigte einen stabilen Phänotyp auf Selektivmedium. Der Phänotyp ähnelt den von Schubert *et al.* (2006) beschriebenen Δ gap1-Mutanten und wurde daher näher untersucht. Die Klonierung der verschiedenen *rasI*-Allele in Selektionsplasmide sollte zeigen, ob die Transformationsausbeute damit verbessert werden kann. Es zeigte sich jedoch, dass die Transformation mit den Plasmiden Raswt/ptrp, RasG12V/ptrp, RasQ61L/ptrp, RasG15N, Raswt/pCHI, RasG12V/pCHI, RasQ61L/pCHI und RasG15N/pCHI nicht zu nennenswerten Steigerungen in der Transformationsrate führten. Es konnten von 200 Transformanten nur zwei in ihrem Phänotyp auffällige Transformanten selektiert werden. Dabei handelte es sich einmal um die Transformation des *S. commune* Stammes II-1 mit dem Plasmid pRasQ61L/ptrp und zum anderen die Transformation des selben Stammes mit dem Plasmid pRasG12V/pCHI. Die beiden Transformanten erhielten die Bezeichnung II-1^{Q61L} und II-1^{G12V}.

Die Transformation der Plasmide CelRaswt/pCHI, CelRasG12V/pCHI, CelRasG15N/pCHI und CelRasQ61L/pCHI mit dem *rasI*-Allel unter dem induzierbaren Promotor des *cell*-Gens, zeigte ähnliche Transformationsraten wie bei den vorherigen Transformationen. Die Selektion der Transformanten erfolgte auf Medien mit Carboxymethylcellulose (CMC). Es konnte nur eine stabile Transformante mit einem auffälligen Phänotyp isoliert werden. Dieser Phänotyp ähnelt denen von konstitutiv aktiven *cdc42*-Mutanten von *S. commune* (Weber, *et al.*, 2005). Die Transformante Cel1T62^{G12V} wurde durch Transformation des Stammes T62 mit dem Plasmid CelRasG12V/pCHI erzeugt.

In den Transformationen mit dem Kontrollplasmiden Raswt/ptrp, Raswt/pCHI und CelRaswt/pCHI kam es zu keinen Auffälligkeiten im Phänotyp. Die Transformation mit dem dominant negativen *rasI*-Allel zeigte keinen Erfolg. Dabei ist nicht klar, ob die Transformation nicht erfolgreich war oder ob die dominant negative Transformation nicht lebensfähig war.

5.3.2 Kopienzahl und Genexpression

Für die Analyse durch Southern-Blot-Hybridisierung wurde chromosomale DNA der Mutantenstämme T2^{G12V}, II-1^{Q61L}, II-1^{G12V} und CellT62^{G12V} und der Wildtypstämme T2 und II-1 untersucht. Am Beispiel von T2^{G12V} und II-1^{Q61L} (Abb. 5.8) kann man erkennen, dass die Stämme zusätzlich zu ihrem Wildtyp-Gen eine mehrfache Integration des mutagenisierten Gens aufweisen. Der Stamm T2^{G12V} besitzt zusätzlich zu seinem Wildtypgen noch sieben Kopien des konstitutiven *rasI*-Gens und der Stamm II-1^{Q61L} noch sechs Kopien. Der Stamm II-1^{G12V} besitzt ein zusätzliches Gen und der Stamm CellT62^{G12V} noch vier weitere Gene (ohne Abbildung). Der Nachweis mehrerer zusätzlicher Gene ist bei ektopischer Transformation nicht ungewöhnlich, da die Integration ins Genom unspezifisch erfolgt.

Die Sequenzierung der genomischen DNA der Mutagenese Stämme zeigte, dass die konstitutiv aktiven *rasI*-Allele in das Genom von *S. commune* integriert wurden.

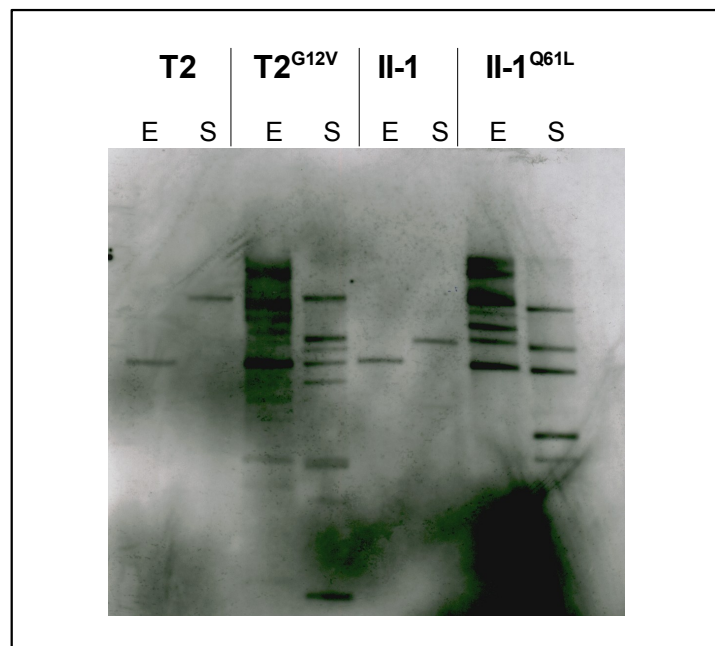


Abb. 5.8: Southernblot der T2G12- und II-1^{Q61L}-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp

Genomische DNA der Stämme T2, T2^{G12V}, II-1 und II-1^{Q61L} wurden jeweils mit *EcoRI* und *SacI* geschnitten. Als Sonde diente das gesamte *rasI*-Fragment. Die beiden Wildtypstämme T2 und II-1 besitzen jeweils nur eine Bande von *rasI*. Konstitutiv aktive Ras1-Transformanten besitzen mehrere Kopien von *rasI*, neben ihren ursprünglichen Wildtyp-Gen. (E = *EcoRI*, S = *SacI*)

Da eine erhöhte Genkopiezahl vorlag, sollte die Genexpression untersucht werden. Die Aktivität des Ras-Proteins in der Zelle wird reguliert, indem GTP oder GDP gebunden wird, d.h. Ras aktiv oder inaktiv vorliegt. Es wird daher erwartet, dass zumindest unter dem *rasI*-Promotor keine erhöhte Expression nachgewiesen wird.

Die Untersuchung der Expression von *rasI* in verschiedenen Stämmen erfolgte mittels quantitativer Real-Time-PCR. Untersucht wurden verschiedene Wildtyp-Monokaryen im Vergleich zu konstitutiv aktiven *rasI*-Stämmen. Ebenfalls wurde ein $\Delta gap1$ -Stamm (F20) mitgeführt. Die Deletion von *gap1* führt zu einer Anreicherung des aktiven GTP-gebundenen Ras-Proteins in der Zelle. Der $\Delta gap1$ -Stamm sollte somit als Vergleich für die Expression der konstitutiv aktiven GTP-gebundenen Ras-Mutanten dienen.

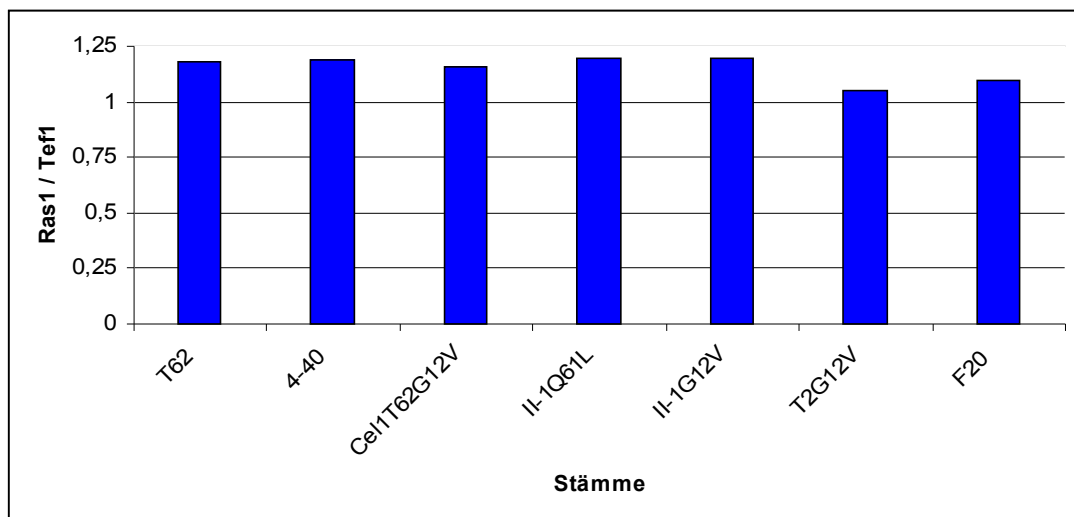


Abb. 5.9: Expression von *rasI* im Verhältnis zu *tef1*

Die Expression von Ras1 verschiedener Wildtypstämme (T62, 4-40) im Vergleich zu konstitutiv aktiven Ras1-Stämmen (Cel1T62^{G12V}, II-1^{Q61L}, II-1^{G12V}, T2^{G12V}) und $\Delta gap1$ (F20). Die Stämme zeigen ähnlich hohe Expressionsniveaus.

Es konnten keine eindeutigen Unterschiede im Expressionsniveau zwischen Wildtyp-Monokaryen, konstitutiv aktiven Ras1-Stämmen und dem $\Delta gap1$ -Stamm F20 gemessen werden (Abb. 5.9). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass *rasI* in der Zelle geringer exprimiert wird als die Vergleichsgene *tef1* und *28S*. Ras1 wird 11-mal weniger exprimiert als Tef1 und sogar 4096 mal weniger als 28S.

Wie erwartet, wurde *ras1* in den konstitutiv aktiven Stämmen nicht höher exprimiert als in den Wildtypstämmen. Die Mutation des konstitutiven *ras1* in *S. commune* führt zur Bindung des GTP und somit zu einer Aktivitätserhöhung und nicht zu einer Expressionssteigerung. Der Effekt der Transformation sollte also am mutierten, konstitutiv aktiven Protein, nicht an der Proteinmenge liegen. Für den Fall des $\Delta gap1$ -Stammes F20 sieht es genauso aus. Hier führt die Deletion von *gap1* dazu, dass das gebundene GTP nicht mehr abgespalten werden kann und Ras in seinem aktiven Zustand in der Zelle vorliegt. Somit kann erklärt werden, dass hier ebenfalls keine erhöhte Expression von *ras1* vorliegt.

5.3.3 Wachstumsrate

Zur Quantifizierung der Wachstumsrate wurde die Zunahme des Koloniedurchmessers pro 24 Stunden auf festem Medien über mehrere Tage bestimmt. Gemessen wurden die Wachstumsraten von monokaryotischen Wildtyp-Stämmen im Vergleich zu den konstitutiv aktiven Ras1-Stämmen.

Während die Wildtyp-Monokaryen 11,2 mm/Tag wuchsen, zeigten die Stämme T2^{G12V} und II-1^{Q61L} ähnliche Wachstumsgeschwindigkeiten mit 4,41-4,95 mm/Tag. Damit zeigten sie eine um 56-61 % verringerte Wachstumsgeschwindigkeit gegenüber dem Wildtyp. Der Stamm II-1^{G12V} wuchs mit einer Geschwindigkeit von 6,35 mm/Tag und zeigt damit nur eine um 43 % verminderte Wachstumsgeschwindigkeit gegenüber dem Wildtyp (Abb. 5.10A).

Die Untersuchung der Wachstumsgeschwindigkeit des Stammes CellT62^{G12V} wurde auf CYM/CMC-Platten durchgeführt, da nur auf CMC der *cell*-Promotor angeschaltet ist. Lässt man aber Wildtypstämmen auf CMC wachsen, zeigen diese ebenfalls eine verminderte Wachstumsgeschwindigkeit. Somit zeigt sich für CellT62^{G12V} eine Verringerung der Wachstumsrate um 30 % gegenüber Wildtypstämmen auf CMC-haltigen Medien. Ein weiterer Effekt des CMC-haltigen Mediums ist die stark verminderte Ausbildung von Luftmyzel (Abb. 5.10 B).

$\Delta gap1$ -Stämme, die einen ähnlichen Phänotyp wie die konstitutiv aktiven *ras1*-Stämme zeigen (Schubert *et al.*, 2006), weisen eine um 25 % verringerte Wachstumsgeschwindigkeit gegenüber dem Wildtyp auf. Der Effekt in der Wachstumsgeschwindigkeit ist in den $\Delta gap1$ -Stämmen demzufolge nicht so stark ausgeprägt wie in den mutierten *ras1*-Stämmen.

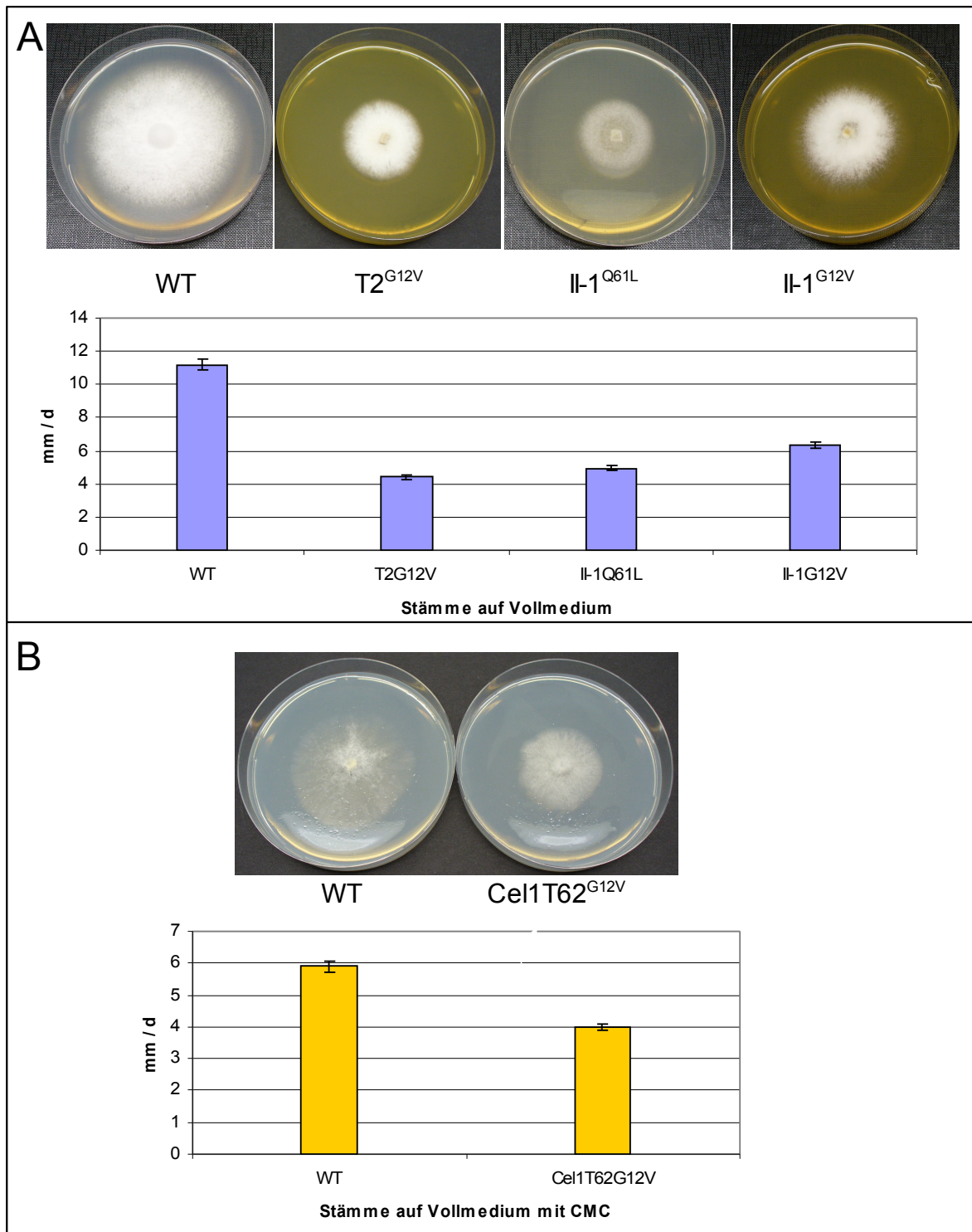


Abb. 5.10 Wachstumsgeschwindigkeit der Ras1-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp

Bestimmt wurde der Koloniedurchmesser der Stämme (pro Stamm n=10) pro Tag in mm. A) Konstitutiv aktive Ras1-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp auf Vollmedium nach 6 Tagen bei 28°C. Die Mutanten zeigen eine Verringerung der Wachstumsgeschwindigkeit gegenüber dem Wildtyp (T2^{G12V} 62 %, II-1^{Q61L} 56 % und II-1^{G12V} 46 %). B) Die Ras1-Mutante Cel1T62^{G12V} im Vergleich zum Wildtyp nach 10 Tagen bei 28°C. Die Mutante zeigt eine um 30 % verringerte Wachstumsgeschwindigkeit auf CMC-haltigen Medium.

5.3.4 Unpolares Wachstum

Lichtmikroskopische Untersuchungen der konstitutiv aktiven Ras1-Stämme zeigten ein verändertes Verhalten im Wachstum des Pilzmyzels auf Festmedien. Während die Hyphen der Wildtyp-Stämme ihre geradlinige Wachstumsrichtung beibehalten, verändern die Hyphen der konstitutiv aktiven *ras1*-Stämme T2^{G12V}, II-1^{Q61L} und II-1^{G12V} ihre Wachstumsrichtung. Die Wachstumsrichtung wird für eine begrenzte Zeit beibehalten und danach geändert, so erscheinen die Hyphen kurvig (Abb. 5.11). Dieser Phänotyp entspricht dem Hyphenwachstum, welches bei *Δgap1*-Stämmen von *S. commune* beobachtet werden konnte (Schubert *et al.*, 2006).

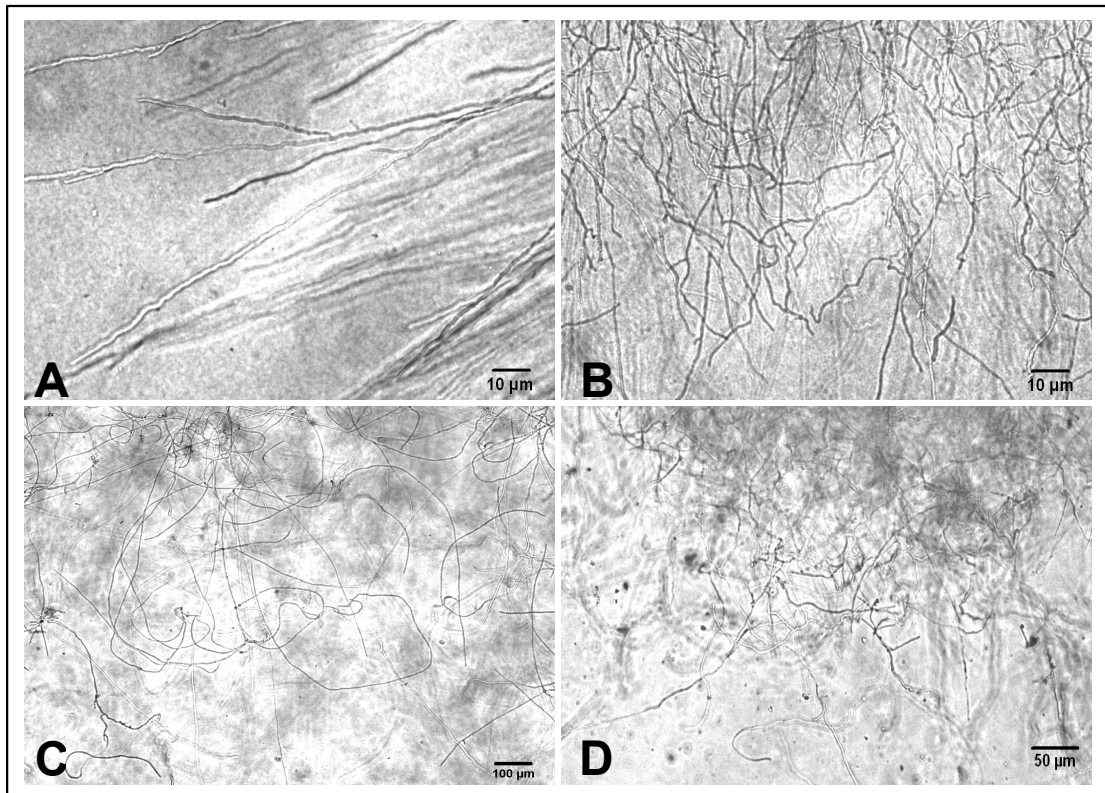


Abb. 5.11: Mikroskopische Untersuchung

Die konstitutiv aktiven Ras1-Mutanten zeigen ein verändertes Verhalten im polaren Wachstum gegenüber dem Wildtyp auf Festmedien. Durch Änderung der Wachstumsrichtung erscheinen die Hyphen kurvig. A) Wildtypstamm T2 B) T2^{G12V} C) II-1^{Q61L} D) II-1^{G12V}.

Bei dem Stamm CellT62^{G12V} konnte noch ein weiterer Phänotyp beobachtet werden. Es kam auf CMC-Medien zur Ausbildung von blasigen Hyphen (Abb. 5.12). Dieser Phänotyp ähnelt den von konstitutiv aktiven Cdc42-Stämmen von *S. commune* (Weber *et al.*, 2005). Es ist nicht auszuschließen, dass der Effekt durch das CMC-haltige Medium hervorgerufen wird, da dieser Phänotyp nicht bei den anderen Transformanten beobachtet werden konnte.

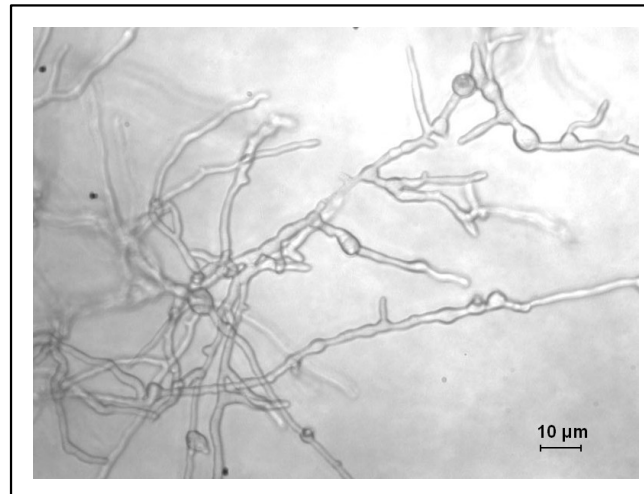


Abb. 5.12: Wachstum der Mutante CellT62^{G12V}

Auf CMC-haltigem Vollmedium konnte die Ausbildung blasiger Hyphen der Mutante CellT62^{G12V} beobachtet werden.

Die veränderte Wachstumsrichtung der Hyphen deutete auf einen Defekt im Zytoskelett hin. Das Zytoskelett besteht aus den Mikrotubuli, den Mikrofilamenten (Aktin) und den intermediären Filamenten. Die Mikrotubuli sind röhrenförmige Strukturelemente aus Protofilamenten, die aus globulären α - und β -Untereinheiten zusammengesetzt sind. Die Funktion der Mikrotubuli bei Pilzen sind der Kerntransport in der Zelle (Raudaskoski, 1972), schnelles Hyphenwachstum (Horio, 2007) und die Beteiligung am polarem Wachstum (Review: Steinberg, 2007a). Immunfluoreszenz-Untersuchungen des α -Tubulins wurde unternommen, um zu sehen, ob Ras1 einen Einfluss auf den Aufbau der Mikrotubuli in *S. commune* zeigt. Untersucht wurden die Pilzhyphen der konstitutiv aktiven Ras1-Stämme T2^{G12V}, II-1^{G12V} und II-1^{Q61L} im Vergleich zum Wildtypstamm 12-43. Aufgrund des ähnlichen Phänotyps wurde für nachfolgende Untersuchungen ein *Δgap1*-Stamm als Parallele mitgeführt.

Es konnte kein auffallender Unterschied im Aufbau der Mikrotubuli zwischen den Mutanten-Stämmen und dem Wildtypstamm beobachtet werden (Abb. 5.12 A-D). Die Mikrotubuli laufen in mehreren Bündeln parallel zur Hyphenachse und reichen bis in die Hyphenspitze (Abb. 5.13E). Damit konnte gezeigt werden, dass Ras1 keinen Einfluss auf das Mikrotubuligerüst in *S. commune* hat.

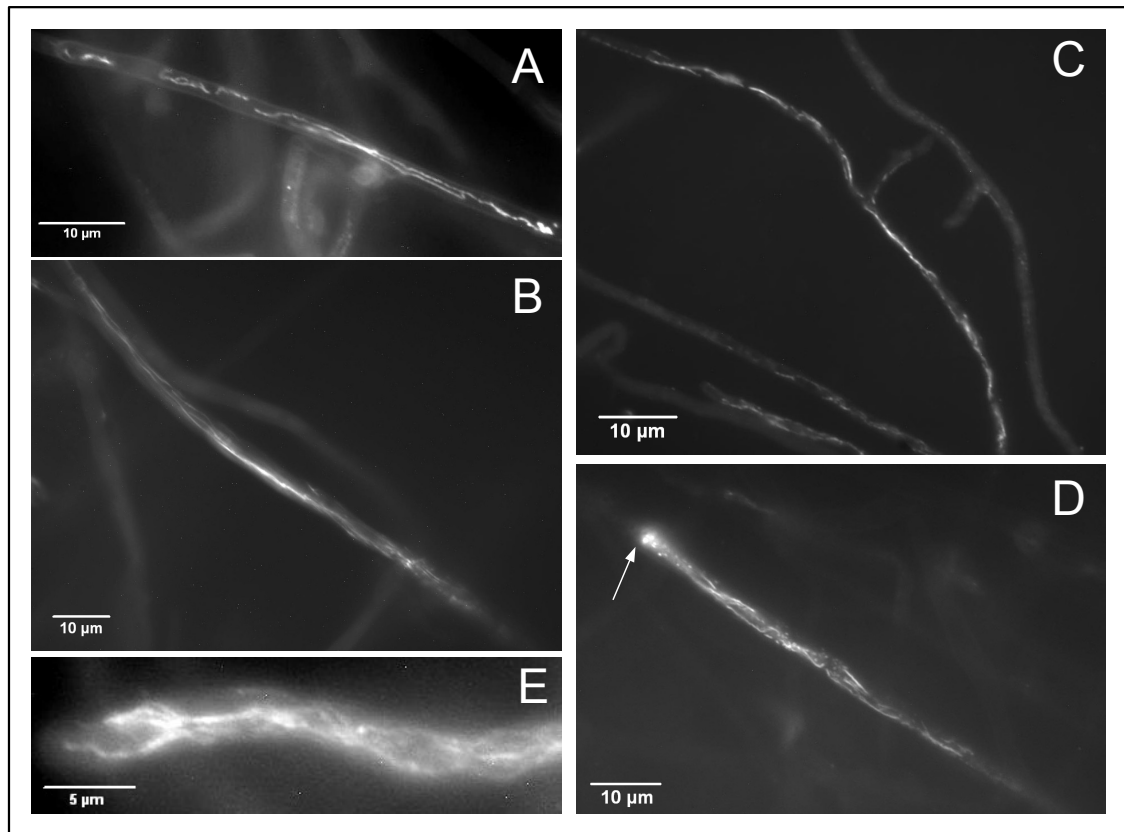


Abb. 5.13 Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Im Vergleich von konstitutiv aktiven Ras1- und Δgap1-Stämmen zu Wildtypstämmen ist zu beobachten, dass es keinen Unterschied in der Ausbildung der Mikrotubuli gibt. Die Mikrotubulistränge sind in mehreren Strängen parallel zur Hyphenachse ausgebildet. A) Wildtyp 12-43, B) II-1^{G12V}, C) Δgap1, D) II-1^{Q61L} (Pfeil zeigt Septum an), E) Mikrotubuli in der Hyphenspitze. (Fotos Elke-Martina Jung, Universität Jena).

5.3.5 Vermehrte Seitenzweigbildung

In mikroskopischen Untersuchungen konnte beobachtet werden, dass es in den konstitutiv aktiven *ras1*-Mutanten zu einer Veränderung in der Ausbildung von Seitenverzweigungen kommt. Man konnte sehen, dass in den Mutantenstämmen T2^{G12V}, II-1^{G12V} und II-1^{Q61L} mehrere Seitenzweige pro Hyphenzelle auftreten (Abb. 5.14). In der Mutante II-1^{Q61L} war dieser Phänotyp besonders ausgeprägt. Die Verteilung war jedoch sehr unregelmäßig, wobei zwei bis neun Seitenzweige pro Hyphenzelle beobachtet werden konnten. Die Länge der Zellen variierte ebenfalls von 29 bis 140 μm . Es ließ sich kein Zusammenhang zwischen Zelllänge und Anzahl der Seitenzweige ableiten. Bei manchen Zellen konnte beobachtet werden, dass sich ein Septum als Abgrenzung bildet, sich aber kein Kern im Seitenzweig befindet. Hier kam es nach einiger Zeit zum Absterben dieser Seitenzweige. In Immunfluoreszenz-Untersuchungen des α -Tubulins in den Verzweigungen konnten keine Auffälligkeiten in der Ausbildung der Mikrotubuli beobachtet werden. Es sind deutlich Mikrotubuli-Stränge in den Seitenhyphen zu beobachten (Abb. 5.14C). Die Ausbildung der vermehrten Seitenzweigbildung scheint also nicht durch ein verändertes Mikrotubuli-Skelett hervorgerufen worden zu sein.

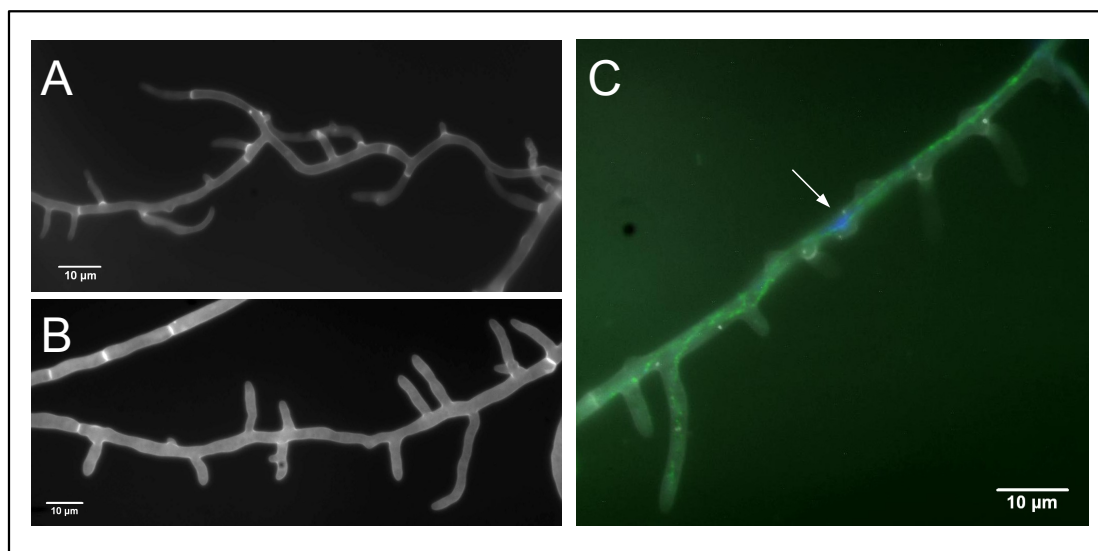


Abb. 5.14: Vermehrte Ausbildung von Seitenhyphen

In den konstitutiv aktiven Ras1-Mutanten konnte eine vermehrte Ausbildung von Seitenzweigen beobachtet werden. Calcofluorfärbung der Zellwände der Stämme II-1^{G12V} (A) und II-1^{Q61L} (B) zeigen mehr als eine Seitenhyphe pro Zelle. (C) DAPI-Färbung des Zellkerns und Immunfluoreszenzfärbung der Mikrotubuli des Stammes II-1^{Q61L} zeigen, dass die Mikrotubuli normal ausgebildet werden und in die Seitenhyphen hineinreichen. Pro Zelle kann nur ein Zellkern beobachtet werden (Pfeil). (Fotos A und C: Elke-Martina Jung, Universität Jena)

5.3.6 Kreuzungen

Um den Effekt der konstitutiv aktiven *ras1*-Allele auf die Entwicklung eines Dikaryons zu bestimmen, wurden die Mutanten mit kompatiblen Wildtypstämmen gekreuzt. Die Kreuzung von Transformanten mit den konstitutiv aktiven *ras1*-Allelen unter der Kontrolle des eigenen Promotors führten zur Ausbildung eines Dikaryons. Mikroskopische Untersuchungen zeigen, dass nur auf der Seite des Wildtyp-Stammes Schnallen zu beobachten waren, d.h. ein Dikaryon ausgebildet wurde. Das Dikaryon ist in der Lage funktionstüchtige Schnallen und Fruchtkörper auszubilden. Die Sporen sind keimfähig, wobei jedoch eine Beeinträchtigung der Keimungen in verschiedenen Kreuzungen zu beobachten war. Die Rate der Sporenkeimung in der Kreuzung von T2^{G12V} mit dem Stamm W21 betrug 51 %. In der Kreuzung II-1^{Q61L} mit dem Wildtyp T62 betrug die Rate der Sporenkeimung sogar nur 40 %. Gleiches lässt sich in Kreuzungen mit aktiven *ras1*-Allelen unter dem induzierbaren Promotor *cel1* beobachten. Die Rate der Sporenkeimung der Kreuzung CelT62^{G12V} mit dem Wildtyp W21 betrug 45 %. Die normale Sporenkeimungsrate liegt bei ca. 93 %. Auffallend bei den heterozygoten Kreuzungen war, dass weniger als 10 % der ausgekeimten Sporen einen veränderten Phänotyp zeigten.

Ebenfalls wurden die Wachstumsraten von heterozygoten Dikaryen bestimmt, die aus den Kreuzungen der konstitutiv aktiven Ras1-Stämme mit kompatiblen Wildtyp-Stämmen stammten (Abb. 5.15). Während die Wildtypkreuzungen mit einer Geschwindigkeit von 5,68 mm pro Tag wuchsen, zeigten die Kreuzungen der konstitutiv aktiven Ras1 Mutanten mit einem kompatiblen Wildtyp eine um 20-28 % verminderte Wachstumsgeschwindigkeit. Die Wachstumsverringerng der Kreuzungen war nicht so stark ausgeprägt wie in den konstitutiv aktiven Ras1-Monokaryen.

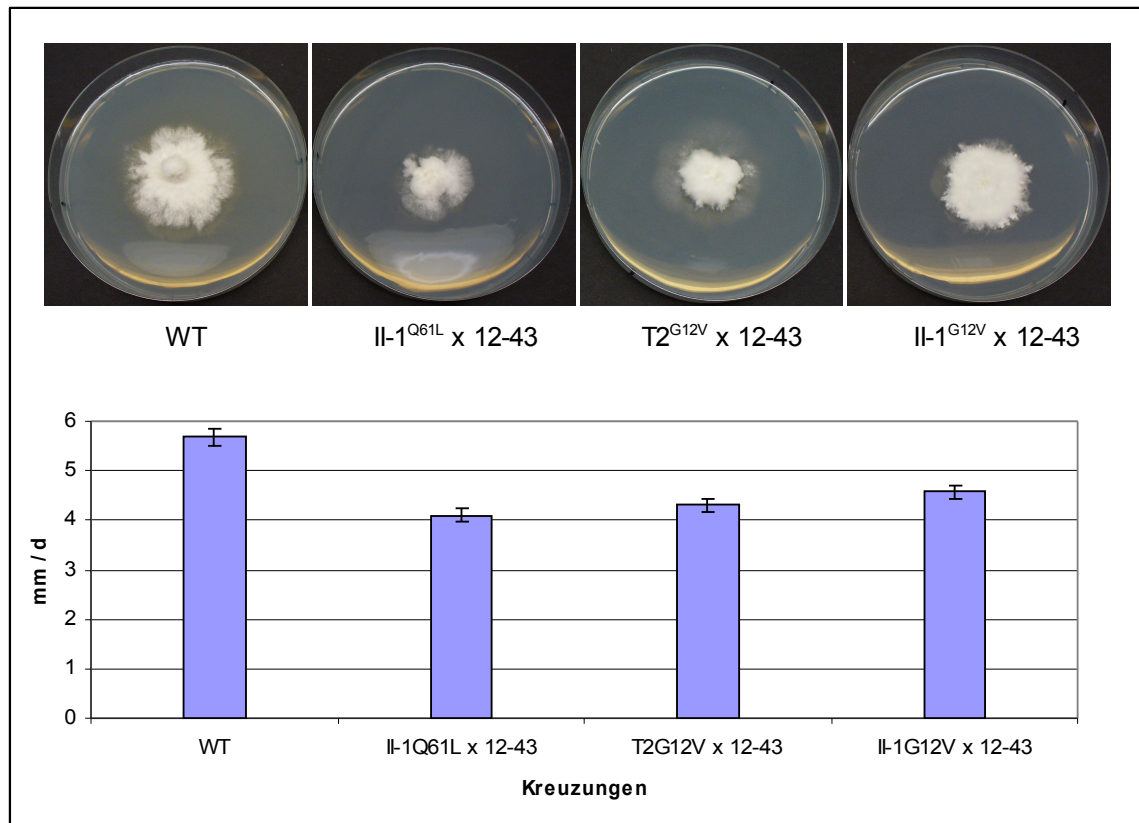


Abb. 5.15 Wachstumsgeschwindigkeit heterozygoter Ras1-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp

Die Mutanten zeigen bei Wachstum auf Vollmedium nach 6 Tagen bei 28°C eine Verringerung der Wachstumsgeschwindigkeit gegenüber dem Wildtyp um 20-28 %. Bestimmt wurde der Koloniedurchmesser der Stämme (pro Stamm n=10) pro Tag in mm.

Bei Kreuzungen von kompatiblen Stämmen mit dem konstitutiv aktiven *ras1*-Allel untereinander (T2^{G12V} x II-1^{Q61L} und T2^{G12V} x II-1^{G12V}) konnte keine Ausbildung von Schnallen oder Fruchtkörpern beobachtet werden. Somit zeigten konstitutiv aktive *ras1*-Allele einen Effekt auf die Kreuzung und Kernwanderung. Der Einfluss von Ras1 auf die Fruchtkörperbildung konnte aufgrund der fehlenden kompatiblen Interaktion in homozygoten Kreuzungen nicht für konstitutiv aktive *ras1*-Allele untersucht werden. Es war aber möglich, homozygote *Δgap1/Δgap1*-Kreuzungen zu untersuchen.

Mikrotomschnitte von sich entwickelnden Primordien der *Δgap1*-Mutante (F15 x F28) wurden mit gleichen Stadien des Wildtyps verglichen (Abb. 5.16). Auffallend war die unterschiedliche Ausbildung des Hymeniums der *Δgap1*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp. Während im Wildtyp die Hyphenenden der Zellen im Hymenium dünn und parallel sind (Abb. 5.16 B), erschienen die apikalen Hyphenenden in der Mutante verdickt

und unregelmäßiger angeordnet (Abb. 5.16 D). Die Mutante ist in der Lage, Basidien auszubilden, in denen eine Karyogamie stattfindet, doch es erfolgt keine Meiose, wodurch es nicht zur Ausbildung von Basidiosporen kommt (Abb. 5.16 F).

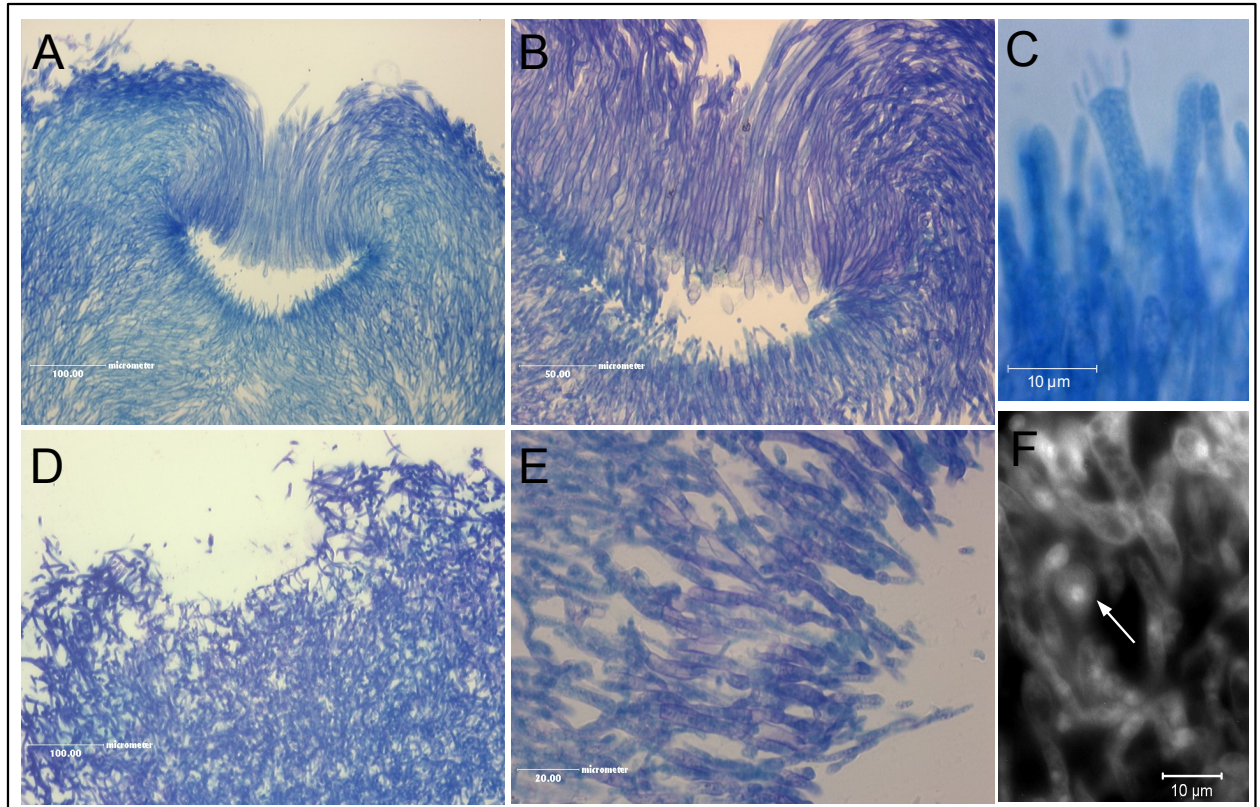


Abb. 5.16: Mikrotomschnitte von Fruchtkörperprimordien von $\Delta gap1/\Delta gap1$ -Kreuzungen

(A-D) Toluidinblaufärbung und E) DAPI-Färbung von Mikrotomschnitten gleicher Fruchtkörperstadien von Wildtyp- und $\Delta gap1$ -Stämmen. A, B) Schnitt durch Fruchtkörper des Wildtyp im Bereich des Hymeniums. C) Basidien bilden sich im Hymenium. An der Basidie kommt es zur Ausbildung von vier Basidiosporen. D, E) Schnitt durch Fruchtkörper der $\Delta gap1$ -Mutante im Bereich des Hymeniums. Die Hyphenenden erscheinen unregelmäßiger angeordnet und sind verdickt im Gegensatz zum Wildtyp. F) Die Mutante ist in der Lage Basidien auszubilden (Pfeil). Die Kernverschmelzung beider Kerne findet statt, aber es erfolgt keine Meiose, wodurch es nicht zur Ausbildung von Basidiosporen kommt. (Bilder A-E: Matthias Gube, Bild F: Florian Hennicke, Universität Jena).

5.4. Intrazelluläre cAMP-Messung und Proteinkinase A-Test

In diversen Pilzen wurde gezeigt, dass Ras auf verschiedene Signaltransduktionskaskaden wirkt. Mit der Messung des intrazellulären cAMP-Spiegels und der Bestimmung der PKA-Aktivität sollte gezeigt werden, ob konstitutiv aktive *ras1*-Allele einen Einfluss auf den cAMP/PKA-Signalweg zeigen. Als Vergleich wurde in beiden Messungen ein *Δgap1*-Stamm mitgeführt.

5.4.1 Intrazellulärer cAMP-Gehalt

Untersuchungen von Schwalb (1974) haben gezeigt, dass cAMP einen Einfluss auf die Fruchtkörperentwicklung bei *S. commune* hat. Durch Zugabe von extrazellulärem cAMP kam es zu einer veränderten Fruchtkörperbildung. Nur wenige Fruchtkörper waren in der Lage, Lamellen auszubilden. Diese Lamellen waren jedoch deformiert und es kam zu keiner Ausbildung von Sporen. Dieser Phänotyp ähnelt den von Schubert *et al.* (2006) beschriebenen *Δgap1*-Stämmen.

Intrazelluläre cAMP-Messungen in konstitutiv aktiven *ras1*-, *Δgap1*- und Wildtyp-Stämmen wurden durchgeführt. Es wurde angenommen, dass es durch die Aktivierung von Ras1 zu einem gesteigerten intrazellulären cAMP-Spiegel kommt, der einen Einfluss auf die Fruchtkörperbildung hat.

Die intrazelluläre cAMP-Messung erfolgte nicht-radioaktiv mit dem „cAMP Direct Biotrak EIA-Kit“ von Amersham Bioscience (Freiberg) und mit dem „cAMP Immunoassay Kit“ von R&D Systems GmbH (Wiesbaden-Nordenstadt). Die Untersuchung mit beiden Kits brachten jedoch nicht den gewünschten Erfolg. Es konnte kein eindeutiger Unterschied im Gehalt von cAMP in den verschiedenen *S. commune*-Stämmen ermittelt werden. Das könnte unter anderem daran liegen, dass in den cAMP-Isolaten aus *S. commune* noch Substanzen wie z.B. Phosphodiesterasen enthalten waren, die den Test negativ beeinflussen haben.

5.4.2 Aktivitätsbestimmung der PKA

Nachdem die intrazelluläre cAMP-Messung keinen Hinweis auf eine veränderte cAMP-Signaltransduktion zeigte, wurde die zelluläre Proteinkinase A-Aktivität verschiedener *S. commune*-Mutanten bestimmt. Dazu wurden Proteinrohextrakte der Wildtyp-Stämme 12-43 und 4-39, der konstitutiv aktiven Ras1-Mutanten T2^{G12V}, II1^{Q61L} und III^{G12V}, sowie Proteine der Δ gap1-Mutanten F15 und F28 isoliert und analysiert. Die Abb. 5.17 zeigt die Auftrennung der Ansätze zur PKA-Aktivitätsbestimmung im Agarosegel bzw. die errechnete spezifische PKA-Aktivität nach der Elution des phosphorylierten Substratpeptids aus dem Agarosegel und der spektrophotometrischen Quantifizierung.

In beiden Wildtypen war keine cAMP-abhängige PKA-Aktivität detektierbar (Abb. 5.17, Spuren 13,15). Eine Aktivierung mit 5 μ M cAMP führte zu keinem signifikanten Anstieg der PKA-Aktivität in den Proteinextrakten beider Wildtyp-Stämme (Abb. 5.17, Spuren 14, 16). In den Ras-Mutationsstämmen und Δ gap1-Stämmen konnte PKA-Aktivität detektiert werden (Abb. 5.17, Spuren 3-12), so dass hier von einer cAMP-abhängiger Protein-kinaseaktivität ausgegangen werden kann.

Interessanterweise konnte auch ohne cAMP-Aktivierung in den Ras-Mutanten und Δ gap1-Mutanten PKA-Aktivität detektiert werden (Abb.5.17, Spuren 3, 5, 7, 9, 11). Die Zugabe von 5 μ M cAMP führte bei diesen Stämmen zu keiner signifikanten PKA-Aktivitäts-Steigerung (Abb. 5.17, Spuren 4, 6, 8, 10, 12). Das liegt vielleicht daran, dass die PKA-Aktivität ihr Maximum erreicht hatte. Durch Aktivierung der Adenylatzyklase durch Ras kommt es zu einem intrazellulären Anstieg des cAMP-Spiegels in der Zelle. cAMP führt zur Aktivierung der PKA. Wenn die PKA-Aktivität in der Zelle ihr Maximum erreicht hat, kann sie durch Zugabe von extrazellulärem cAMPs auch nicht mehr gesteigert werden.

Es konnte keine deutlich höhere Zunahme der PKA-Aktivität in den Wildtypstämmen und Δ gap1-Stämmen nach Zugabe von cAMP gemessen werden. Grund ist vermutlich, dass die Veränderung der PKA-Aktivität zu gering war, um sie mit dieser Methode nachweisen zu können.

Im PKA-Aktivitätsassay waren im Wildtyp zwei in Richtung Kathode wandernde, nicht phosphorylierte Peptid-Fraktionen zu erkennen. PKA-unabhängige, unspezifische Interaktionen von anderen Rohextrakt-Proteinen mit den fluoreszierenden Substratpeptiden könnten zu deren langsameren Laufverhalten und damit zum Auftreten der zweiten nicht phosphorylierten Peptid-Fraktion im Agarosegel geführt haben.

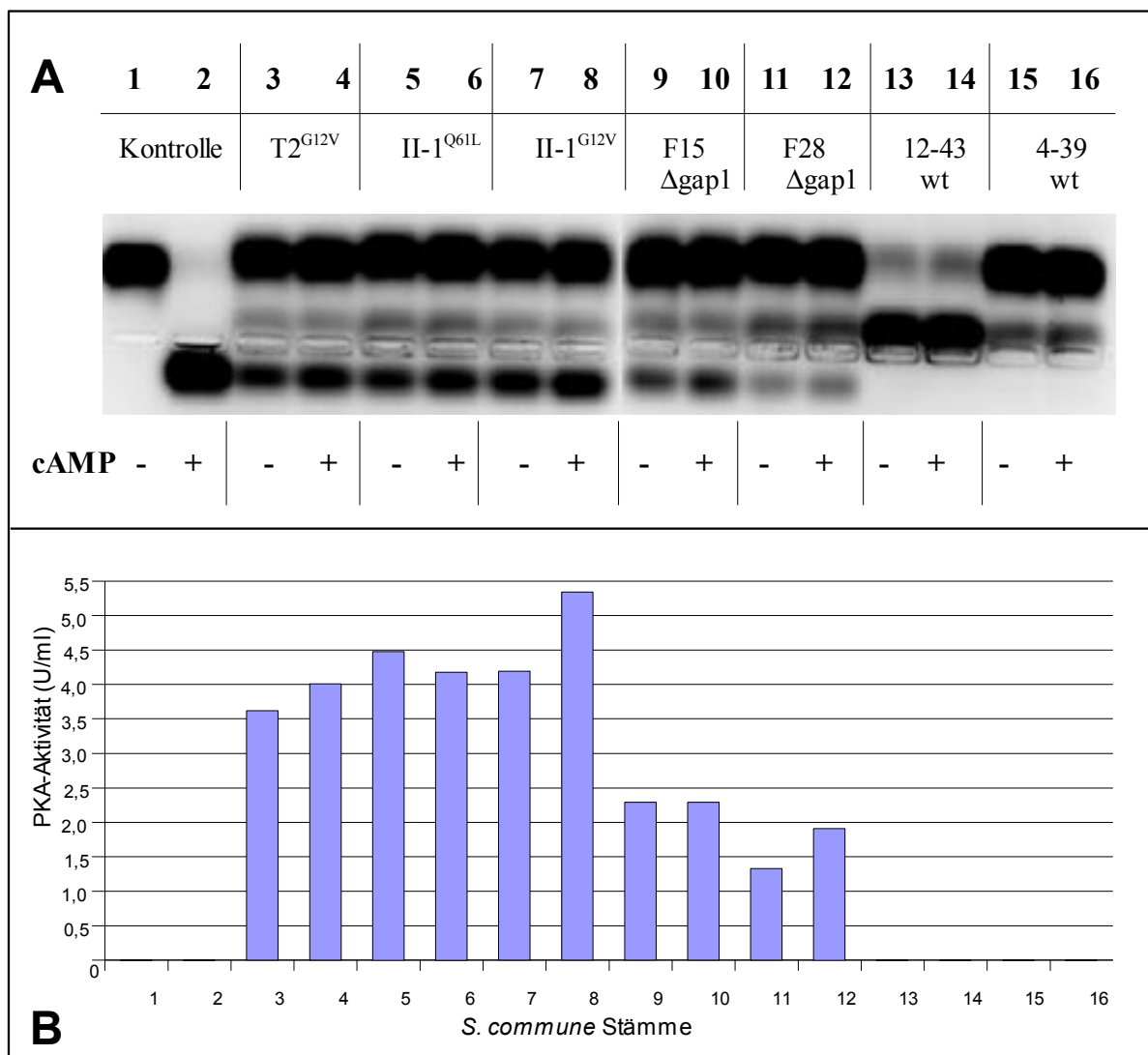


Abb. 5.17 Einfluss von konstitutiv aktiven Ras1 auf die PKA Aktivität über PKA-Assay

A) Elektrophoretische Auftrennung des phosphorylierten und nicht-phosphorylierten Substratpeptids. Nicht-phosphoryliertes Substrat besitzt eine positive Ladung und läuft zur Kathode (oben). Phosphoryliertes Substrat besitzt eine negative Ladung und läuft zur Anode (unten). 1, 2 = Kontrollen, 3-16 Proben mit und ohne Zusatz von cAMP. B) quantitative Bestimmung der PKA-Aktivität

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die konstitutive Aktivierung von Ras1 und die Anreicherung des aktiven, GTP-gebundenen Ras der Δ gap1-Mutante zu einer deutlichen Steigerung der cAMP-abhängigen PKA-Aktivität führt und somit eine Wirkung von Ras1 auf die PKA nachweisbar ist.

5.5 Identifizierung von *tpk* aus *S. commune*

In den konstitutiv aktiven *ras1* Mutanten konnte eine erhöhte PKA-Aktivität festgestellt werden und somit eine Wirkung von Ras1 auf die cAMP/PKA-Signaltransduktionskaskade. Die Proteinkinase A ist ein Heterodimer aus zwei regulatorischen und zwei katalytischen Untereinheiten. Die Bindung von cAMP führt zur Freisetzung der aktiven katalytischen Untereinheiten und aktiviert verschiedene Effektorproteine. Ein Gen aus dieser Signalkaskade, die katalytische Untereinheit der PKA, sollte aus *S. commune* isoliert und charakterisiert werden.

5.5.1 Isolierung und Charakterisierung von *tpk* aus *S. commune*

Ein mit degenerierten Primern amplifiziertes genomisches Fragment von *tpk* diente als Ausgangsprodukt, um die gesamte genomische Sequenz von *tpk* zu isolieren (Lengeler, unveröffentlicht; Knabe, 2001). Dafür wurde zuerst eine Southern-Hybridisierung durchgeführt, um geeignete DNA-Fragmente für eine Koloniehybridisierung zu identifizieren. Dafür wurden je 20 µg genomische DNA des *S. commune* Stammes 4-40 mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten, nach Gelelektrophorese auf eine Membran übertragen und mit DIG-markierter Sonde bei 68°C hybridisiert. Als Sonde diente das 588 bp große PCR-Fragment. Als geeignete Größe für die Koloniehybridisierung erschienen zwei *SacI*-Fragmente der Größe 2,0 kb und 1,8 kb. Sequenzierung des PCR Fragments ergab, dass sich der *SacI*-Schnitt etwa mittig im *tpk*-Gen befand.

Durch die Herstellung einer partiellen Genbank von 1 bis 3 kb großen *SacI*-Fragmente in den pBluescript II SK-Vektor und anschließender Koloniehybridisierung konnte der Klon p44S isoliert werden, der mit der *tpk*-Sonde hybridisierte. Die Sequenzierung des Inserts und der Vergleich mit der Datenbank zeigte, dass es sich um das 2,0 kb große *SacI*-Fragment handelte und den N-Terminus des *tpk*-Gens enthielt. Es war nicht möglich, das 1,8 kb *SacI*-Fragment mittels Koloniehybridisierung zu isolieren. Durch TAIL-PCR mit dem sequenzspezifischen Primern Tpkdown4, Tpkdown5, Tpkdown6 und Tpkdown7 konnte das 3'-Ende von *tpk* amplifiziert werden.

GAGCTCTCGTCGGACACCAAGTCATGATCAAGTACTTACTCTCCTCATATATCGGTAGAATACCTTAGGCTCTCCCTCTC	80
CTCTCCTCTAGGCACTTTCATGTCTCGGATCCTTAATGCATGCTTTGTATGCAATTACCCACCGGTCCTTCAGCGA	160
CGCGACCAGATCTCGCCGCGCAACACAACCGTGAGAAGGCGCACGTGTCGCGGTTCGGGACGGAATTCCTCGCCCT	240
CAACTTGCTCTTCAACGCCCGCTGCCACACCTTCTTCTCTCTGTGTCTTCAATTCGCGGAAGCGTAGCTCGAA	320
GTAGCTACGATAGATCAATACCCGTCATGTCTCGCTGAATATCTCGACTACGCTACCGCACGGTCACTTTTCGTGT	400
GTGGCTGTGGCGCATGGGCTATCTATGCCGGGTGGACCGTGCAATTCGACACTCTCAGGAGAGGAAGAAGTAAGACGCG	480
CCACAAATGAATCAATTGACACCTTAC TGACGTGTAA TACAGAGGTGCGAATACTCTGTGATGAGGT TTTTAATTCGC	560
TGATGCCCGTTGCTCCAGCTCA TGGAAACGACACGCGA AAGACAAGGACTTCAAGCTAGAAGTCAAGAA GAAGGTAATGT	640
CTACACCGTTTGTATGCGATTAGCTTGC TGATTGCAAA TCAGGAGGAGGCGAGGGAAGAGC TGC TTGCGAAGCAGGCTGT	720
TAGCAACGTGTACGGCCTGAATT CCTAGGT TGC CGGGG TCAC TGCACAAC TGC CGGCTCGCTTGTACA GCATGACGATC	800
CAGGGCGT GCGCTGTGTATAGATAGGTGTGCGGTCCTTGTCCG TACGCCACGTCCGACC GCCCGCGCTGTGCG ATACTT	880
CGCGGCGG TCATGGGTAGAACAAAAGCCGAGTATGCGAATAC ACCTCTGC TCAC TGC TCAACTCT TTGCGCGC CCCCGA	960
GGCTTTGA AGGTGAGTGCAATGGCACGCTTCG TGCTTGCTCA CGTTGT TGGCAT AAGGGTT TGGTCTGGCGGT GACAG	1040
TTCAAGGC TGTCATAAT TACGGCTTGATGAT TAATTAGCAC TGTC CGCGCCTGATATTCATCATATATGCTTGAA	1120
CAGCCACA GCTAGTCAATTGTATTCGCTAGCTAGTCTGCTTC CCCC TACC TACTGAGGCTCGGAAGCTTGCT TCACTC	1200
AAGGAAGT CGGAGTTCGAGGGCCACAGGCTGCACGTGTGGGGT AGGC GCCC ACGAGGCGGCGATCCGATGCCCA AACCG	1280
GGATGAAT GAGCACTGTTTGGTCCCGCATTCATTTCATATCCC GTCTTTTGTGTTTCTCTCTCTTGC TTCC CCCACC	1360
ACCAACGCC CCCACCCGCCCTTTCGCTCCCCTTTCGCTCCCC ACCCTC TGGAATGTCCGTTATCAAGCGCATGACGGAG	1440
CGCTTCCA CATCGGTTGAGCAAGGGT TACCAGTACCCCGATG TCGACGTGCGCGGTAGCCCGTAC TCGACCGC GCCGAC	1520
R F H I G S S K G Y Q Y P D V D V G G S P Y S T A P T	
GCCGTGCG TCATATCCGCAATACGACGCTATT TGATCACCGC GGATCCCTCAGCACCCAGCGCACGTCGTTCACGAGC	1600
P S L I S A N T T L F D H R G S L S T Q R T S F S E	
TGAGCGGC CATCGCAGGGCTCGGCGCATCCCGGAGCAGGA GGACATGGAAGCGCGCTTGAATCGGCTGCAC CTGTTT	1680
L S G H R Q G L G A I P E O E D M E A R L N R L H L F	
TCGCGAAA CAAGGGCATCTATCGATTGCGAGGAC TTCTCATCC AGCGGACGCTGGGACGGGACGCTTCGGAGCGTGT	1760
S R N K G I Y R L Q D F L I Q R T L G T G S F G R V L	
CCTCGgtg cggtgcttgcgttgatcatcgcgacgccccgggtgc ttatgtctccgccccgaGTGC GGAGCAAG CACAAC	1840
L V R S K H N	
CTGCGCTTCTACGCGATCAAGGTGCTCAACAAGGAGAAGGTGC TCCGCATGAAGCAGGTGCGAGCACACCAACAA CGAGCG	1920
L R F Y A I K V L N K E K V L R M K Q V E H T N N E R	
GAACATGT TGCACCGCTCAACCAACAATTCATCATCAACCTC TGGGCGCGTTCCAGGACGGGAACAACATGTACATGG	2000
N M L H R V N H N F I I N L W G A F Q D G N N L Y M	
TCATGGAC TTCGTCGCCGCTGGCGAGCTCTTCAACCTGT TCGCGCGATCGATTgtgcgtagcgatgcttacctggagtc	2080
V M D F V P G G E L F N L L R R S I	
ccccctcg tgcgtgatgcaagccccacagaGATTCCTGAAACCCG TCGCGAAGTTCTACGCTGC TGAAGTCTCCCTTGCCCT	2160
R F P E P V A K F Y A A E V S L A L	
TCGATACC TCCACTCAACAACATCATATACCGGACTTGAAG CCGTGAACACCTCTCC TCAACGCAGACGGCC ACATCA	2240
R Y L H S N N I I Y R D L K P E N I L L N A D G H I	
AGGTGCTGACTTTGGCGTCGCCAAGATCGTGCACACAGTGGC CTACACTCTCTCGGGACACACAGATTATCTGCAACCA	2320
K V A D F G V A K I V D T V A Y T L CGT P D Y L A P	
GAGATCTG GGGCGGCCGCTACAGCAATCCGCTGATTGGTACG CCTCGGCGTTCTTTGCTACGAGATGCTCTCGGCC	2400
E I W G G R Y S K S V D W Y A L G V L C Y E M L S G L	
CCCGCCCT TCCTACCCCGACGGCAACCCGCAACCTGTAC GCCAAGATCCGCGAGGGCCCCAACTCCCTTCCTGGA	2480
P P F L T P D G N P Q T L Y A K I R E G P N S L P W	
ACTCGCCC AACTTCACGCCCTACTCCAACGACCTATCCGGCGGCTCATGGAGGCGGGGCC TCGAAGCGGTACGGTAAC	2560
N S P N F T P Y S I D L I R R L M E G G P S K R Y G N	
ATCGCTCA CGGGGCCGCGACGCTGTCGCGACCCGTGGTTTCG CGGAGGTCGACTGGGGGAAGCTGGGGGACCGGGAAGT	2640
M R H G A G D V F A H P W F A E V D W G K L G D R E V	
GAGCCGCG CGTATATTCCGAATATCGGGGCGCGGGGATGCG TCGGCGTTTGACATTACCACGAGGATGGGA TGGAGG	2720
S P P Y I P N I G G A G D A S A F D I Y H E D G M E	
AGCTCTTC AGGCCCGCCACCACTCGACACGCTCGCGGACAGTT CCCC GACTTTGACTACG TACGACGGTTCTGCTGGCT	2800
E L F R P P P L D T L A D Q F P D F D Y T Y D G S V A	
CCTTGATT TAGCGATTCCCTTCTCTCTCGGTCACGGACAC CCTCTATCTCGCACGGCCGCTCCC GTGCC TTGTAT	2880
P	
GACTGCTC TCCCCCTGTCCATGCTGGGCACGC ACCGGA TGGG CCAC AAGTGGATGCAC <u>AACAAA</u> GACTCGCTACTCGC	2960
ATACGTGACTTTCGACCCATATCTGGGATAT TCCATTCCAACCATAGCTAGGTATAC ACGATAACGATAGGTATCGAG	3040
ATACAGCC TTCTGAGCGTAC TACACAAAGTACACCTCCCGCG CTCCGAGCGCGTAAACGAACGACAGAGTACATACGA	3120
AGGAAAGC TAGCTGCAATCAC	3141

Abb. 5.18: Sequenz des *tpk* Gens von *S. commune* 4-40

Dargestellt ist die zusammengesetzte Sequenz aus dem Klon p44S und den Sequenzen der TAIL-PCR. Die AS-Sequenz des offenen Leserahmens ist unter der DNA-Sequenz im Ein-Buchstabencode angegeben. Die Introns sind durch klein gedruckte Basen gekennzeichnet. Das vermutete Polyadenylierungssignal AACAAA ist unterstrichen. Fett hervorgehoben sind die konservierten Bereiche GTGSFK, RDLKPEN, DFGFAK und die konservierten Aminosäuren LxxxPxxL.

Die vollständige Sequenz aus dem Klon p44S und der Sequenzen aus der TAIL-PCR enthielten den gesamten ORF von *tpk*. Zur Bestimmung der Introns wurde die genomische Sequenz mit amplifizierter cDNA Sequenz verglichen. Das *tpk*-Gen besitzt eine Länge von 1393 bp, mit einem ORF von 1277 bp. Dieser wird durch zwei Introns mit der Länge von 58 und 55 bp unterbrochen. Das davon abgeleitete Protein setzt sich aus 423 Aminosäure-Resten zusammen, was eine kalkulierte molekulare Masse von 48,14 kDa ergibt. Zusätzlich enthält das Fragment einen 5'-Bereich von 1413 bp und einen 3'-Bereich von 330 bp. Die vollständige Struktur von *tpk* aus *S. commune* ist in Abb. 5.18 dargestellt.

Der 5'-Bereich von 1413 bp enthält vermutlich den gesamten Promotorbereich, obwohl typische Promotorelemente wie die TATA-Box und die CAAT-Box nicht genau lokalisiert werden können. Eine das Startcodon umgebene Kozak-Sequenz ist nicht zu erkennen.

Der 3'-Bereich des Gens *tpk* ist 330 bp lang. Ein für Eukaryoten typisches Polyadenylierungssignal (AAUAAA, Wahle, 1992) ist in diesem Bereich nicht zu erkennen, jedoch eine AACAAA-Sequenz, die vermutlich eine ähnliche Funktion erfüllt.

Die abgeleitete Aminosäuresequenz von *tpk* ergab Übereinstimmung mit mehreren katalytischen Untereinheiten von cAMP-abhängigen Proteinkinasen A (PKA). Die Aminosäuresequenz zeigt mit 67 % identischen Aminosäuren die größte Ähnlichkeit zu einem hypothetischen Protein von *Laccaria bicolor* (Genbankeintrag EDR00550), 65 % identischen Aminosäuren zu Uka1 von *Ustilago maydis* (AAC24234), 65 % zur katalytischen Untereinheit Pka2 von *Cryptococcus neoformans* (AAM74045), sowie 57 % Identität mit PkaC1 von *Aspergillus fumigatus* (CAC82611).

Im Sequenzvergleich von *tpk* aus *S. commune* mit katalytischen Untereinheiten der PKA aus verschiedenen Organismen kann man wichtige funktionelle Domänen erkennen (Abb. 5.19). Die Kinasedomäne im C-Terminus mit ca. 260 Aminosäuren ist in allen Proteinkinasen hoch konserviert (Taylor *et al.*, 1993). Das RDLKPEN-Motiv der katalytischen Schleife (AS: 233-239) und das DFGFAK-Motiv (AS: 252-257), welches an der Mg^{2+} -Bindung beteiligt ist, sind wichtige Sequenzmotive. Ein weiterer konservierter Bereich ist die Nukleotidbindestelle GTGSFK (AS: 108-113) und die Phosphorylierungssequenz LxxxPxxL (AS: 266, 270 und 273) (Knighton *et al.*, 1991).

222	L	R	T	I	G	T	G	S	F	G	R	V	H	L	V	Q	S	K	H	N	Q	R	-	-	-	-	F	Y	A	V	K	V	L	K	K	A	Q	V	V	K	M	K	Q	V	C. trifolii	
101	Q	R	T	I	G	T	G	S	F	G	R	V	H	L	V	R	S	K	H	N	G	R	-	-	-	-	F	Y	A	I	K	V	L	N	K	E	R	I	V	R	M	K	Q	I	C. cinerea	
207	E	R	T	I	G	T	G	S	F	G	R	V	H	L	V	R	S	R	H	N	G	R	-	-	-	-	F	Y	A	V	K	V	L	N	K	E	K	V	I	K	M	K	Q	V	C. neoformans pkal	
24	Q	R	T	I	G	T	G	S	F	G	R	V	H	L	V	R	S	K	H	N	L	R	-	-	-	-	F	Y	A	I	K	V	L	N	K	E	R	I	V	K	M	K	Q	V	L. bicolor	
54	V	E	T	I	G	T	G	T	F	G	R	V	L	L	V	R	L	K	D	R	D	V	A	D	R	S	A	Y	F	A	L	K	V	L	A	K	T	D	V	I	K	L	K	Q	V	U. maydis uka1
104	Q	R	T	I	G	T	G	S	F	G	R	V	L	L	V	R	S	K	H	N	L	R	-	-	-	-	F	Y	A	I	K	V	L	N	K	E	K	V	L	R	M	K	Q	V	S. commune	
262	E	H	T	N	D	E	R	R	M	L	G	E	V	K	H	P	F	L	I	T	L	W	G	T	F	Q	D	S	K	N	L	Y	M	V	M	D	F	V	E	G	G	E	L	F	S	C. trifolii
141	E	H	T	N	N	E	M	K	M	L	E	S	V	Q	H	P	F	I	I	N	L	W	A	S	-	-	-	-	-	-	C	V	D	L	G	Y	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C. cinerea
247	E	H	T	N	S	E	R	E	M	L	V	R	V	R	H	P	F	L	V	N	L	W	G	T	F	Q	D	V	N	N	L	Y	M	V	M	D	F	V	A	G	G	E	L	F	S	C. neoformans pkal
64	E	H	T	N	N	E	Q	H	M	L	E	H	V	Q	H	P	F	I	I	N	L	W	G	S	F	Q	D	A	G	N	L	Y	M	V	M	D	F	V	P	G	G	E	L	F	T	L. bicolor
99	S	H	I	N	S	E	R	C	I	L	T	K	V	D	H	P	F	L	V	N	M	I	A	S	F	Q	D	S	K	N	C	Y	M	L	M	E	Y	V	V	G	G	E	I	F	S	U. maydis uka1
144	E	H	T	N	N	E	R	N	M	L	H	R	V	N	H	N	F	I	I	N	L	W	G	A	F	Q	D	G	N	N	L	Y	M	V	M	D	F	V	P	G	G	E	L	F	N	S. commune
307	L	L	R	K	S	G	R	F	P	N	P	V	A	K	F	Y	A	A	E	V	T	L	A	L	E	Y	L	H	S	R	D	I	I	Y	R	D	L	K	P	E	N	L	L	L	D	C. trifolii
171	-	-	-	R	S	Q	R	F	P	D	P	V	A	K	F	Y	A	A	E	V	A	L	A	L	N	Y	M	H	S	L	D	I	V	Y	R	D	L	K	P	E	N	I	L	L	N	C. cinerea
292	L	L	R	K	S	Q	R	F	P	N	S	V	A	K	F	Y	A	A	E	V	A	L	A	L	D	Y	L	H	S	L	D	I	I	Y	R	D	L	K	P	E	N	L	L	L	G	C. neoformans pkal
109	L	L	R	S	N	R	F	P	D	P	V	A	K	F	Y	A	A	E	V	A	L	A	L	N	Y	L	H	T	L	D	I	V	Y	R	D	L	K	P	E	N	I	L	L	N	L. bicolor	
144	Y	L	R	R	A	G	H	F	S	A	D	V	A	R	F	Y	I	S	T	I	V	L	A	I	E	Y	L	H	S	N	K	V	V	Y	R	D	L	K	P	E	N	L	L	I	D	U. maydis uka1
189	L	L	R	S	I	R	F	P	E	P	V	A	K	F	Y	A	A	E	V	S	L	A	L	R	Y	L	H	S	N	N	I	I	Y	R	D	L	K	P	E	N	I	L	L	N	S. commune	
352	R	H	G	H	L	K	I	T	D	F	G	F	A	K	R	V	P	D	K	T	W	T	L	C	G	T	P	D	Y	L	A	P	E	V	V	S	N	K	G	Y	N	K	S	V	D	C. trifolii
213	V	D	G	H	I	K	I	A	D	F	G	F	A	K	L	C	A	T	T	T	W	T	L	C	G	T	P	D	Y	L	A	P	E	I	V	S	Q	Q	R	Y	N	K	S	V	D	C. cinerea
337	A	D	G	H	V	K	V	T	N	F	G	F	A	K	Y	V	P	D	I	T	W	T	L	C	G	T	P	D	Y	L	A	P	E	V	V	Q	S	K	G	Y	N	K	S	V	D	C. neoformans pkal
154	T	D	G	H	I	K	I	A	D	F	G	F	A	K	L	C	M	T	T	T	W	T	L	C	G	T	P	D	Y	L	A	P	E	I	V	N	Q	Q	R	Y	N	K	S	V	D	L. bicolor
189	S	N	G	Y	T	K	I	T	D	F	G	F	A	K	E	V	E	D	R	T	W	T	L	C	G	T	P	E	Y	L	A	P	E	I	I	Q	C	S	G	H	G	S	A	V	D	U. maydis uka1
234	A	D	G	H	I	K	V	A	D	F	G	F	A	K	I	V	D	T	V	A	Y	T	L	C	G	T	P	D	Y	L	A	P	E	I	I	W	G	G	R	Y	N	K	S	V	D	S. commune
397	W	W	S	L	G	I	L	I	Y	E	M	L	C	G	Y	T	P	F	W	D	S	G	S	P	-	-	-	L	K	I	Y	E	N	I	L	K	G	K	-	-	V	K	Y	P	A	C. trifolii
258	W	Y	A	L	G	V	L	I	F	E	M	L	S	G	L	P	P	Y	H	Q	P	E	-	-	P	N	H	L	A	L	Y	E	K	I	M	R	G	P	K	N	I	R	W	P	A	C. cinerea
382	W	Y	A	L	G	V	L	I	F	E	M	L	A	G	Y	P	P	F	E	T	E	D	G	N	P	-	-	M	K	L	Y	E	K	I	I	A	G	K	-	-	V	R	Y	P	T	C. neoformans pkal
199	W	Y	A	L	G	V	L	I	F	E	M	L	S	G	L	P	P	Y	H	Q	G	D	S	P	N	H	L	V	L	Y	E	R	I	T	R	G	P	A	Y	I	K	W	P	A	L. bicolor	
234	W	W	S	L	G	I	L	I	F	E	M	L	A	G	Y	P	P	F	Y	D	-	-	-	P	N	P	I	L	I	Y	E	K	I	L	A	G	-	-	N	L	V	F	P	E	U. maydis uka1	
279	W	Y	A	L	G	V	L	C	Y	E	M	L	S	G	L	P	P	F	H	T	P	D	G	N	P	Q	-	-	T	L	Y	A	K	I	R	E	G	P	T	S	L	P	W	N	S	S. commune
437	-	Y	I	N	P	D	A	Q	D	L	L	S	K	L	I	T	A	D	L	T	K	R	L	G	N	L	Y	G	G	P	N	D	V	K	T	H	P	W	F	Q	E	V	T	W	D	C. trifolii
301	A	A	F	N	E	N	A	T	D	L	I	L	K	L	M	E	G	D	P	S	R	R	Y	G	N	L	R	H	G	A	G	D	V	F	A	H	P	W	F	R	E	V	D	W	D	C. cinerea
423	-	Y	F	D	A	L	A	K	E	L	L	K	N	L	I	G	D	L	T	K	R	Y	G	N	L	R	A	G	S	S	D	I	F	A	H	G	W	F	A	E	V	D	W	D	C. neoformans pkal	
244	A	-	F	S	E	N	A	T	D	I	I	L	K	L	M	E	S	D	P	S	R	R	Y	G	N	L	Q	H	G	A	G	D	V	F	A	H	P	W	F	R	E	V	D	W	E	L. bicolor
273	E	-	I	D	P	L	S	R	D	L	I	S	S	L	T	A	D	R	S	R	R	L	G	N	L	R	G	A	N	D	V	K	N	H	P	W	F	H	G	V	D	W	K	U. maydis uka1		
322	P	N	F	T	L	Y	S	I	D	L	I	R	R	L	M	E	G	E	P	S	K	R	Y	G	N	M	R	H	G	A	G	D	V	F	A	H	P	W	F	A	E	V	D	W	E	S. commune

Abb. 5.19: Sequenzvergleich der Kinasedomänen von katalytischen Untereinheiten der cAMP-abhängigen Proteinkinase A.

Verglichen wurden katalytische Untereinheiten von *C. trifolii* (Genbank-Zugriffsnummer: AAC04335), *C. cinerea* (EAU91698.1), *C. neoformans* Pka1 (AAM74047), *L. bicolor* (EDR00550), *U. maydis* Uka1 (AAC24234) und *S. commune* Tpk. Identische Aminosäuren wurden schwarz markiert. Besonders gekennzeichnet (Box) sind die funktionellen Domänen RDLKPEN, (katalytischen Schleife), DFGFAK (Mg^{2+} -Bindung), GTGSFK (Nukleotidbindestelle) und LxxxPxxL (Phosphorylierung).

5.5.2 Nachweis von Homologen zu *tpk* im Genom von *S. commune*

Mit einer Southern-Blot-Hybridisierung wurde überprüft, ob das Gen *tpk* in mehreren Kopien im Genom von *S. commune* vorliegt. Dazu wurden genomische DNA mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten, elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nylon-Membranen übertragen. Die Membranen wurden unter unterschiedlich stringenten Bedingungen mit einer *tpk*-Sonde hybridisiert. In Abb. 5.20 erkennt man als eine Bande im Blot unter weniger stringente Bedingungen, d.h., dass mindestens ein weiteres Gen mit der Sonde *tpk* kreuzhybridisiert. Mit diesem Ergebnis wurde gerechnet, da die katalytischen Untereinheiten in anderen Organismen auch in mehreren Kopien im Genom auftreten. So besitzt z.B. *S. cerevisiae* drei katalytische Untereinheiten (Toda *et al.*, 1987), *C. neoformans* (D'Souza *et al.*, 2001; Hicks *et al.*, 2004) zwei und *U. maydis* zwei (Ort *et al.*, 1995; Dürrenberger *et al.*, 1998).

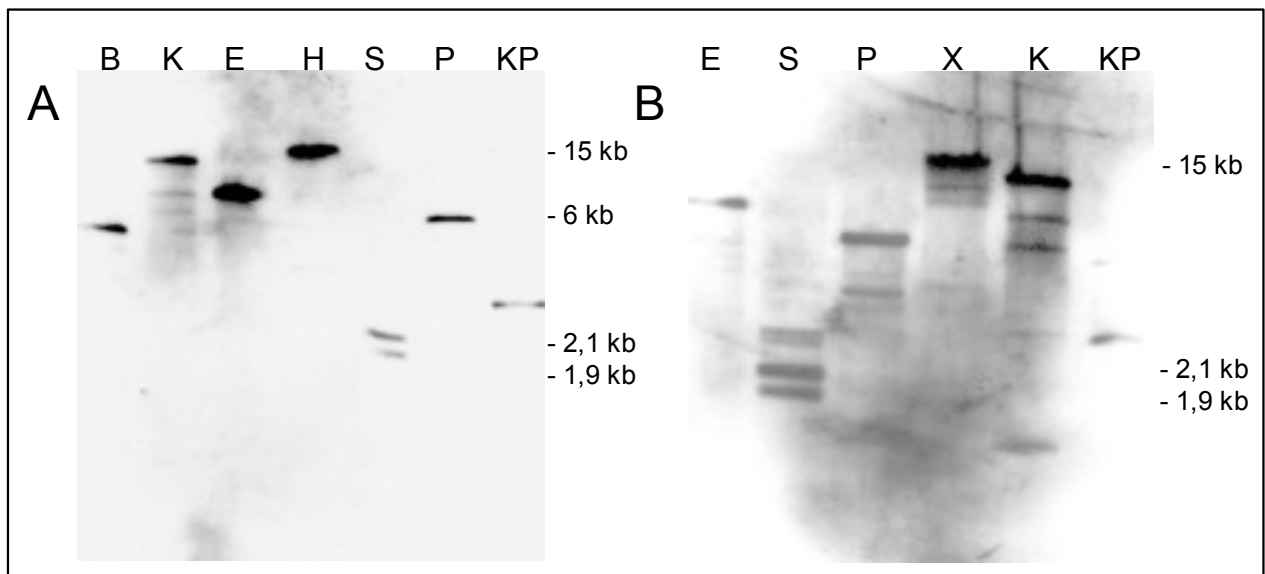


Abb. 5.20: Kopienzahl des *tpk*-Gens in *S. commune* 4-40

Chromosomale DNA aus *S. commune* wurde mit unterschiedlichen Restriktionsendonucleasen behandelt. Die auf Membranen übertragene DNA wurde bei unterschiedlich stringenten Bedingungen mit einer *tpk*-Sonde hybridisiert. A) Southernblot bei 68°C, B) Southernblot bei 55°C, B = *Bam*HI, K = *Kpn*I, E = *Eco*RI, H = *Hind*III, S = *Sac*I, P = *Pst*I, X = *Xba*I, PK = Kontrolle

5.5.3 Untersuchung der Expression von *tpk*

Die Aktivität von *tpk* in der Zelle wird reguliert, indem cAMP an die regulatorischen Untereinheiten der PKA bindet und die aktiven katalytischen Untereinheiten freigesetzt werden. Dieser Prozess ist also cAMP-abhängig. Nachdem ein Einfluss der konstitutiv aktiven *ras1*-Mutanten auf die PKA-Aktivität gezeigt werden konnte, sollte die Expression von *tpk* mittels quantitativer Real-Time-PCR in Wildtypstämmen gegenüber den konstitutiv aktiven Ras1-Stämmen und Δ gap1-Stämmen untersucht werden. Es wurde erwartet, dass *tpk* in den Mutanten Stämmen nicht höher exprimiert wird als im Wildtyp, da Ras keinen Einfluss auf die Expression der PKA besitzt, sondern auf deren Aktivität. Es konnten keine eindeutigen Unterschiede im Expressionsniveau zwischen Wildtyp-Monokaryen, konstitutiv aktiven Ras1-Stämmen und dem Δ gap1-Stamm F20 im Vergleich zu *Tef1* gemessen werden. Es zeigte sich aber, dass *tpk* in der Zelle geringer exprimiert wird als die Vergleichsgene *tef1* und *28S*. Dabei waren ähnliche Expressionsraten zu beobachten wie bei der Expression von *ras1* (Abb. 5.21).

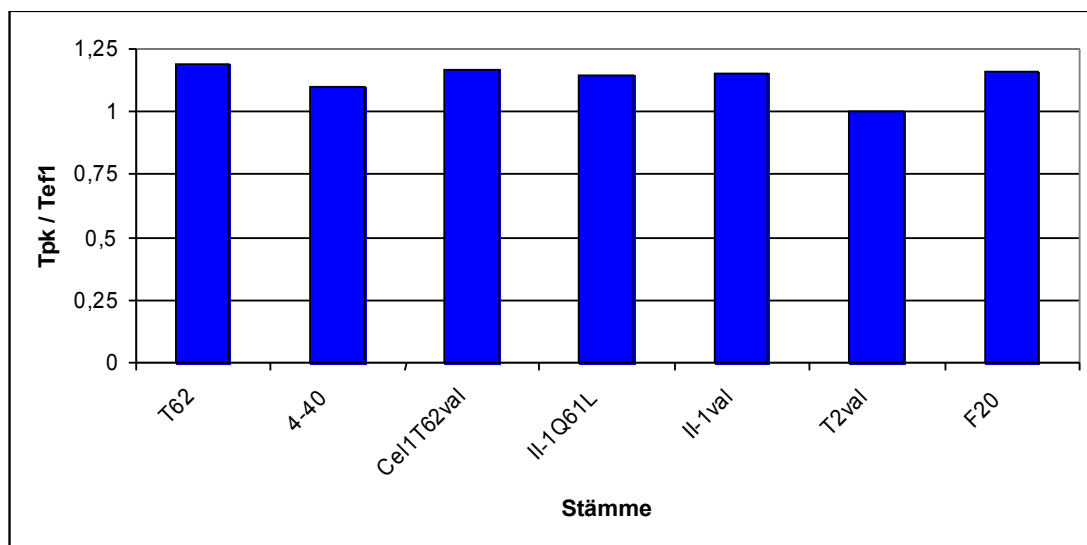


Abb. 5.21: Expression von *tpk* im Verhältnis zu *tef1*

Die Expression von *tpk* verschiedener Wildtypstämmen (T62, 4-40) wurde mit konstitutiv aktiven Ras1-Stämmen (Cel1T62^{G12V}, II-1^{Q61L}, II-1^{G12V}, T2^{G12V}) und dem Δ gap1-Stamm F20 verglichen. Die Stämme zeigen ähnlich hohe Expressionsniveaus.

Wie erwartet, wurde *tpk* in den konstitutiv aktiven Stämmen und im *Δgap1* Stamm nicht höher exprimiert als in den Wildtypstämmen. Die konstitutiv aktive Mutation von *ras1* in *S. commune* führt zu einer Aktivitätserhöhung der PKA durch Bindung des cAMP und nicht zu dessen Expressionssteigerung und somit auch nicht zu einer Erhöhung der Proteinmenge in der Zelle.

6. Diskussion

Die Untersuchungen des G-Proteins Ras in diversen Pilzen zeigte eine zentrale Rolle des Proteins in verschiedenen Signaltransduktionskaskaden, die u.a. wichtig sind für die Zellmorphologie, die Interaktion mit Kreuzungspartnern, die Reaktion auf Stress und die Zellpolarität. Ziel der Arbeit war die Untersuchung der Funktionen der Gene *ras1* und *tpk* in der sexuellen Entwicklung des Homobasidiomyceten *Schizophyllum commune*. Dazu wurden zunächst die entsprechenden Gene isoliert. Zur Untersuchung von Ras1 wurden konstitutiv aktive Mutanten erzeugt und charakterisiert und mit dem Phänotyp einer RasGap-Deletion verglichen.

6.1 Die chromosomale Struktur von *ras1*

Ausgehend von einem bekannten cDNA-Fragment konnte das vollständige für Ras1 codierende Gen isoliert und seine Sequenz bestimmt werden. Durch Vergleich der genomischen DNA-Sequenz mit der cDNA-Sequenz wurden die Exon-Intron-Grenzen ermittelt und 5'- und 3'-nicht translatierte Bereiche identifiziert. Das *ras1* Gen hat eine Länge von 834 bp mit einem ORF von 576 bp. Das abgeleitete Protein besteht aus 191 Aminosäureresten. Am 5'-Ende wurde ein Bereich von 960 bp und am 3'-Ende ein Bereich von 111 bp charakterisiert.

Der 5'-Bereich von 960 bp enthält vermutlich den gesamten Promotorbereich, obwohl klassische Promotorelemente nicht eindeutig zuzuordnen sind. Da *S. commune* nicht vollständig sequenziert ist und bisher nur wenig Gene isoliert und charakterisiert wurden, ist es schwierig Aussagen über die Länge und Sequenz typischer Promotorelemente zu machen. Untersuchungen von Schuren (1992) haben gezeigt, dass die TATA-Box, wenn vorhanden, stark in ihrer Sequenz und ihrer Position konserviert ist und eine CAAT-Box meist nicht vorhanden ist. Im Bereich der TATA-Box kann in *ras1* um die Position -47 vor dem Transkriptionsstartpunkt eine AT-reiche Region erkannt werden (ATTT), die eventuell eine ähnliche Funktion übernehmen kann. Sequenzvergleiche der 960 bp des 5'-Bereichs mit der Datenbank brachten keinen Hinweis auf ein weiteres Gen stromaufwärts von *ras1*. Eine das Startcodon umgebene Kozak-Sequenz (CCA/GCCAUTG, Kozak, 1984) und ein typisches Polyadenylierungssignal, AAUAAA (Wahle, 1992) des 3'-Bereichs sind nicht zu erkennen.

Der offene Leseraster des Gens *ras1* umfasst 834 bp und wird von vier Introns unterbrochen. Ein zusätzliches Intron befindet sich vor dem Translationsstartpunkt. Die Introns variieren zwischen 47 und 113 bp. Die bislang gefundenen Introns in *S. commune* sind bis auf wenige Ausnahmen recht kurz. Ihre Länge variiert in der Regel zwischen 45 bp und 65 bp. Die Introns von *ras1* liegen mit einer Ausnahme im üblichen Größenbereich. Die Sequenzen im Bereich der Spleißstelle sowie der internen Sequenzen für die Ausbildung der Lariatstruktur weisen nur wenig Abweichungen zu den für *S. commune* bestimmten Konsensussequenzen auf (Abb. 6.1).

	5'-Ende	Lariat	3'-Ende	Länge
Intron 1	GTCCGC	CACTCAC	CAG	48 bp
Intron 2	GTCAGT	CGCTGAT	CAG	48 bp
Intron 3	GTAAGC	CGCTGAC	CAG	113 bp
Intron 4	GTGCGT	TACTCAC	CAG	47 bp
Intron 5	GTGCGT	CACTCAT	CAG	49 bp
Konsensus	GTRAGT	YRCTRAY	YAG	

Abb. 6.1: Konservierte Intronsequenzen des Gens *ras1*

Angegeben sind die konservierten Sequenzen im 5'- und 3'- Spleißbereich der Introns, die interne Konsensussequenz zur Bildung der Lariatstruktur sowie die Länge der Introns. Zum Vergleich wurde die bisher ermittelte Konsensussequenz aus den Genen für Introns aus *S. commune* angegeben (R=A/G, Y=C/T).

Der chromosomale GC-Gehalt in *S. commune* liegt bei etwa 57 % (Dons *et al.*, 1979). Der GC-Gehalt der kodierenden Bereiche von *ras1* ist um bis 6 % höher und in den nicht translatierten Bereichen sowie den Introns bis 6 % niedriger als dieser Wert. Des weiteren ist der GC-Gehalt schwach exprimierter Gene in der Regel niedriger als der stark exprimierter Gene. Das Gen *ras1* weist einen GC-Gehalt von 55 % auf, was einem niedrig exprimierten Gen entspricht.

Außerdem lässt sich durch die Überprüfung des Codongebrauchs eine Aussage zur Expression von Genen machen. Hoch exprimierte Gene aus *S. commune* zeigen, wie in vielen anderen Organismen, einen zum Teil stark eingeschränkten Codongebrauch. So verwenden die hoch exprimierten Gene *tefl* oder *Sc4* nur 45 bzw. 32 der 61 möglichen Codons (Schuren, 1992). Bei *ras1* kommen 53 von 61 möglichen Codons vor, was ein Hinweis auf ein niedrig exprimiertes Gen ist.

Expressionsuntersuchungen mittels quantitativer Real-Time-PCR haben die Aussage bestätigt, dass *ras1* ein gering exprimiertes Gen ist. Im Vergleich zu den bekannten, stark exprimierten Genen *tefl* und *28S* wird *ras1* 11-mal bzw. 4096-mal weniger exprimiert.

Die abgeleitete Aminosäuresequenz von Ras1 zeigte Übereinstimmungen mit Ras aus verschiedenen Pilzgruppen, aber auch zu den humanen Ras-Proteinen. Die größten Übereinstimmungen gibt es mit verschiedenen Basidiomyceten, wie *Laccaria bicolor* (92 % Identität), *Suillus bovinus* (82 %), *Coprinopsis cinerea* (80 %) und *Ustilago maydis* (57 %). Im Sequenzvergleich von Ras1 aus *S. commune* mit verschiedenen Ras-Proteinen kann man die funktionell wichtigen Elemente der Ras-Superfamilie als hoch konservierte AS-Sequenzen erkennen.

Drei Sequenzbereiche, die an der GTP-Bindung beteiligt sind, sind in den verschiedenen G-Proteinen stark konserviert. Die drei Motive sind: GXGXXG, DXXG und NKXD. Die „switch“-Regionen I und II sind wichtige Bereiche, die ihre Konformation während der GTP-Bindung verändern (Sprang, 1997). Die switch I-Region wird auch als Effektorregion bezeichnet.

Das CaaX-Motiv am C-Terminus (C = Cystein, a = aliphatische Aminosäure, X = beliebige Aminosäure) ist für die Lokalisierung von Ras in der Plasmamembran verantwortlich und wird in drei posttranslationalen Reaktionen modifiziert. Zuerst wird das Cystein farnesyliert, was die Bindungsaffinität zum Endoplasmatischen Reticulum erhöht. Dort erfolgt die Abspaltung der drei Aminosäuren -aaX und die Methylierung der carboxy-terminalen Gruppe von Cystein, wobei eine hydrophobe Domäne am C-Terminus gebildet wird. Für die Lokalisierung des Proteins in der Plasmamembran wird eine weitere Modifizierung benötigt. Diese erfolgt durch eine Palmitoylierung eines weiteren Cysteins stromaufwärts oder benachbarter Bereiche des CaaX-Motivs (Lowy, 1993).

In verschiedenen Pilzen, wie z.B. *C. neoformans*, *S. cerevisiae* und *U. maydis* gibt es je zwei Ras-Homologe. Viele andere besitzen aber auch nur ein homologes Ras-Gen, wie z.B. *C. albicans*, *L. bicolor* und *L. edodes*. Es wurden bisher jedoch noch keine Pilze beschrieben, die drei Gene besitzen, die für ein Ras-Protein codieren, so wie beim Menschen (H-ras, K-ras, N-ras).

Da das Genom von *S. commune* noch nicht sequenziert ist, wurde über ein unspezifischen Southern-Blot nach homologen Genen zu *ras1* gesucht. Da man nur eine Bande im Southern-Blot unter wenig stringenten Bedingungen beobachten konnte, wird vermutet,

dass *ras1* nur in einer Kopie im Genom von *S. commune* vorliegt. Zur Bestätigung müsste ein Sequenzvergleich mit der gesamten genomischen DNA durchgeführt werden. Ein Sequenzierungsprojekt von *S. commune* wurde gestartet, ist bis jetzt aber noch nicht abgeschlossen.

Es ist zu beobachten, dass bei Pilzen mit zwei homologen Ras-Proteinen, eines stärker exprimiert wird und auch andere Funktionen übernehmen kann. Bei *S. cerevisiae* ist beispielsweise zu beobachten, dass beide Ras-Proteine essentiell sind, da die Deletion von *RAS1* und *RAS2* letal ist. *RAS1* wird jedoch geringer exprimiert als *RAS2*. Die Deletion von *RAS2* bewirkt, dass das invasive Wachstum der haploiden Hefen nicht mehr möglich ist. *RAS1* wird zu gering exprimiert, um den Defekt von *RAS2* zu komplementieren. Nur durch die Überexpression von *RAS1* kann der Wildtyp-Phänotyp wieder hergestellt werden (Mösch *et al.*, 1999). Ähnliches ist bei *C. neoformans* zu beobachten. Die humanpathogene Hefe *C. neoformans* besitzt ebenfalls zwei Ras Gene. Ras2 wird geringer exprimiert als Ras1 und die Deletion von *ras2* zeigt keinen auffallenden Effekt im vegetativen Wachstum oder in der Ausbildung der Virulenz. Die Deletion beider Gene ist in *C. neoformans* jedoch nicht letal (Waugh *et al.*, 2002). Obwohl für *C. neoformans* nicht beide Proteine zum Überleben wichtig sind wie bei *S. cerevisiae*, erfüllen die zwei Ras-Proteine unterschiedliche Funktionen in beiden Organismen. In allen untersuchten Pilzen sind Ras-Proteine an konservierten Signaltransduktionskaskaden beteiligt, wodurch sie ähnliche Funktionen und Phänotypen besitzen.

6.2 Die Funktion von Ras1 in *S. commune*

Da angenommen wurde, dass es sich bei *ras1* von *S. commune* um ein essentielles Gen handelt und die Deletion des Gens somit letal wäre, wurde die Untersuchung der Funktion von *ras1* anhand von konstitutiv aktiven Mutanten durchgeführt. Mutationen in der GTP-Binderegion wurden *in vitro* eingefügt, was zu konstitutiv gebundenen GTP führte. Die Transformation von *ras1* erfolgte ektopisch unter dem nativen Promotor und mit einem induzierbaren Promotor. Es wurden Versuche unternommen, ein dominant negatives *ras1*-Allel zu charakterisieren, doch erhielt man keine auffallenden Phänotypen nach der Transformation. Es ist daher möglich, dass die Transformanten mit dem dominant negativen *ras1*-Allel nicht mehr lebensfähig waren.

6.2.1 Expressionsuntersuchungen

Southern-Blot-Untersuchungen der konstitutiv aktiven Ras1-Transformanten zeigten, dass das modifizierte *ras1*-Gen mehrfach in das Genom von *S. commune* integriert wurde. Das Wildtypgen war ebenfalls noch vorhanden. Da es sich hier um eine ektopische Integration und nicht um eine homologe Rekombination handelte, bei der das Wildtypgen mit dem modifizierten Gen ausgetauscht wird, war das Ergebnis des Southern-Blots nicht ungewöhnlich. Die konstitutiv aktiven Ras-Allele konnten durch Sequenzierung der genomische DNA in den Transformanten nachgewiesen werden.

Expressionsuntersuchungen von *ras1* mittels quantitativer Real-Time-PCR ergaben keine wesentlichen Abweichungen in der Expressionsrate zwischen Wildtyp-Monokaryen im Vergleich zu konstitutiv aktiven *ras1*-Transformanten und *Δgap1*-Mutanten. Da durch die Mutation von Ras1 in *S. commune* ein konstitutiv GTP-gebundenes, d.h. ein ständig angeschaltetes, aktives Protein erzeugt wurde, war zu erwarten, dass die unveränderte Expressionskontrolle für Ras1 in der Mutante nicht zu höherer Expression führt.

Die Untersuchung der Expression erfolgte mit quantitativer Real-Time-PCR. Durch Verwendung des interkalierenden Farbstoffs „SYBR-Green“ lässt sich durch Fluoreszenzmessung die Menge des sich bildenden Produkts graphisch darstellen. In den konstitutiv aktiven Ras1-Mutanten ist das Wildtypgen noch vorhanden. Da sich der „SYBR-Green“-Farbstoff jedoch unspezifisch in das sich bildende Produkt einlagert, kann also keine Unterscheidung zwischen dem konstitutiv aktiven *ras1*-Allele und dem Wildtyp-Allel erfolgen. Um ausschließlich die Expression des mutierten Allels zu bestimmen, müsste eine andere Methode angewandt werden, z.B. die Verwendung von „Molecular Beacons“. Diese spezifischen Sonden sind dafür geeignet, einzelne Nukleotidveränderungen im Gen zu detektieren. Untersuchungen mit „Molecular Beacons“ konnten jedoch wegen der ungünstigen Lage der Mutagenesestelle (G12V) nicht durchgeführt werden.

Durch Untersuchungen der Expression von Ras1 unter verschiedenen Umweltbedingungen (z.B. C-Mangel, N-Mangel) oder in verschiedenen Stadien der Fruchtkörperentwicklung, könnte eine Aussage gemacht werden, ob Ras1 weitere Funktionen im Wachstum und in der Entwicklung von *S. commune* besitzt. In *A. nidulans* wurde eine regulatorische Rolle von RasA in der Entwicklung des Pilzes nachgewiesen (Som und Kolaparthi, 1994). Eine hohe Aktivität von RasA führt zu einer Inhibierung der Keimschlauchbildung, wobei die

Kernteilung nicht beeinträchtigt ist. Bei niedriger Aktivität von RasA wird die Konidiophorenbildung gehemmt. Bei mittlerer Aktivität wird zudem die Ausbildung von Luftmyzel gehemmt. Die Deletion von *rasA* führt zu einem Verlust der sexuellen Vermehrung. Somit besitzt RasA neben einer essentiellen Rolle in der sexuellen Vermehrung auch eine regulatorische Rolle in der Entwicklung bei *A. nidulans*.

Da Ras1 ein Schalterprotein ist und nur durch die Bindung von GTP aktiviert wird, kann es sein, dass Ras gleichmäßig im Organismus exprimiert wird. Untersuchungen an *L. edodes* haben gezeigt, dass Ras während der Fruchtkörperentwicklung gleichmäßig hoch exprimiert wird, während gesteigerte cAMP-Niveaus zu verzeichnen sind (Hori *et al.*, 1991). Spätere Untersuchungen in *L. edodes* zeigten jedoch eine räumlich unterschiedliche Expression von Ras in verschiedenen Bereichen des Fruchtkörpers (Tanaka *et al.*, 2005).

Die Untersuchungen in *A. nidulans* und *L. edodes* haben gezeigt, dass die Aktivität des Ras-Proteins Einfluss auf die Entwicklung des Pilzes haben kann bzw. dass unterschiedliche Aktivität von Ras in verschiedenen Bereichen des Pilzes vorkommt. Somit wären weitere Untersuchung der Expression von Ras1 in *S. commune* wichtig, um die Funktion von Ras in diesem Organismus klarer zu bestimmen.

6.2.2 Wachstumsrate

Die Wachstumsraten wurden durch Messung der Zunahme des Koloniedurchmessers pro Tag auf festem Vollmedium bestimmt. Im Vergleich zu Wildtyp-Monokaryen zeigten konstitutiv aktive *ras1*-Stämme T2^{G12V} und II-1^{Q61L} eine signifikante Reduktion der Wachstumsrate um 56-61 % bzw. 43 % beim Stamm II-1^{G12V}. Zu beobachten war ebenfalls, dass die Ausbildung von Luftmyzel in den Mutanten etwas geringer war als im Wildtyp.

Die heterozygoten Dikaryen zeigten im Vergleich zu Wildtyp-Dikaryen eine Reduktion der Wachstumsrate um 20-28 %. Die nicht so stark ausgeprägte Verringerung der Wachstumsgeschwindigkeit der Dikaryen liegt vermutlich daran, dass die Mutante Kerne abgeben, aber nicht aufnehmen kann. Das entstandene heterozygote Dikaryon weist daher einen Wildtyp-Charakter auf. Homologe Kreuzungen waren nicht möglich.

Die Mutante CellT62^{G12V} zeigte eine um 30 % verminderte Wachstumsgeschwindigkeit gegenüber dem Wildtyp auf CMC-haltigen Medien. Ebenfalls war zu beobachten, dass die Mutante kaum Luftmyzel bildete. Die Ursache dafür liegt allerdings am CMC-haltigen Medium, da der Wildtyp auf CMC ebenfalls nicht in der Lage war, Luftmyzel zu bilden.

Während meist nur die Deletion von Ras zu einer Verringerung des Wachstums führt, z.B. bei der Deletion von *rasB* in *A. fumigatus* (Fortwendel *et al.*, 2005) oder *ras1* von *C. albicans* (Leberer *et al.*, 2001), konnte eine Verringerung des Wachstums in dominant aktiven RasA-Transformanten bisher nur beim humanpathogenen Pilzes *Penicillium marneffei* beobachtet werden (Boyce *et al.*, 2005). Die dominant aktiven RasA-Transformanten von *P. marneffei* zeigen keinen Defekt im polaren Wachstum. Dies war bei *S. commune* allerdings der Fall.

Denkbar wäre sogar, dass die verringerte Wachstumsgeschwindigkeit auf Festmedium bei *S. commune* durch die Veränderung des polaren Wachstums hervorgerufen wird. Während der Änderung der polaren Achse könnte es zu einem zwischenzeitlichen Wachstumsstopp der apikalen Hyphen kommen, was sich dann in einer Verringerung der Wachstumsgeschwindigkeit gegenüber dem Wildtyp bemerkbar macht.

6.2.3 Zytoskelett

Apikale Hyphen von konstitutiv aktiven Ras1-Stämmen ändern während des Wachstums ihre Richtung, was zu einem ungerichteten, zufälligen Wachstum der Hyphen führte. Die Fähigkeit sich radial auszubreiten geht dabei jedoch nicht verloren. Gleiches ist bei *Agap1*-Mutanten zu beobachten.

Das polare Wachstum filamentöser Pilze findet an der Hyphenspitze statt (Bartnicki-Garcia und Lippman, 1969). Eine wichtige Funktion übernimmt dabei der Spitzenkörper, der als Verteilungszentrum für Vesikel („vesicle supply center“) dient (Bartnicki-Garcia *et al.*, 1995; Riquelme *et al.*, 1998; Steinberg 2007b). Der Spitzenkörper ist nur in wachsenden Hyphenspitzen zu finden, ebenso bildet er sich an Stellen von Verzweigungen, und die Lage des Spitzenkörpers in der Hyphenspitze korreliert mit der Richtung des Hyphenwachstums (Harris *et al.*, 2005). Eine Untersuchung an lebenden Hyphen von *N. crassa* zeigte einen Zusammenhang zwischen dem Verlauf der Wachstumsachse und der Position des Spitzenkörpers (Riquelme *et al.*, 1998). Wie die Position des Spitzenkörpers genau festgelegt wird, ist unklar. Zahlreiche Untersuchungen belegen eine Rolle des Zytoskeletts und der Motorproteine für die Festlegung der Richtung des polaren Wachstums (Howard, 1981; Vargas *et al.*, 1993; Rupeš *et al.*, 1995; Sampson und Heath, 2005; Steinberg, 2007b; Uchida *et al.*, 2008).

Der Transport von sekretorischen Vesikeln aus dem Zytoplasma zum Spitzenkörper erfolgt entlang der Mikrotubuli, einem Proteinpolymer, bestehend aus α - und β -Tubulin. Der weitere Transport der Vesikel vom Spitzenkörper zur Plasmamembran des Apex, dem Ort der Zellwandsynthese, erfolgt über die Mikrofilamente (F-Aktin), einem Proteinpolymer aus globulären Aktinmonomeren. Der Spitzenkörper dient somit als „Wechselstation“ von den Mikrotubuli zu den Mikrofilamenten. Der Transport der Vesikel erfolgt durch Motorproteine, die sich in verschiedene Klassen einteilen lassen. Myosine bewegen sich entlang der F-Aktine, während Kinesine und Dyneine entlang der Mikrotubuli wandern (Reviews: Fischer 1999; Steinberg 2006, 2007a).

In *S. commune* ist das polares Hyphenwachstum ebenfalls abhängig von einem organisierten Zytoskelett mit globulären Aktin an der Hyphenspitze (Raudaskoski *et al.*, 1991) und parallel zur Hyphenachse organisierten Mikrotubuli (Raudaskoski *et al.*, 1988). Untersuchungen haben gezeigt, dass die Mikrotubuli in 4-5 Strängen parallel zur Hyphenachse laufen und kurz vor der Hyphenspitze enden (Raudaskoski, 1988). Die Mikrotubuli sind für den Kerntransport verantwortlich (Raudaskoski, 1972) und sind vermutlich auch am polarem Hyphenwachstum beteiligt, da die Mikrotubuli in der Hyphenspitze mit verschiedenen Membranvesikeln assoziiert sind (Raudaskoski, 1991). Untersuchungen mit Nocodazol, einem Mikrotubuli destabilisierenden Reagenz, zeigte eine vollständige Depolymerisierung der Mikrotubuli mit einer vermehrten Bildung von Verzweigungen in der Hyphenspitze und zufälligem polarem Wachstum (Rupeš *et al.*, 1995). In elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Hyphenspitzen von *S. commune* wurde ebenfalls der aus Vesikeln und Filamenten bestehende Spitzenkörper nachgewiesen (Rupeš *et al.*, 1995). Aktin ist nicht nur in der Hyphenspitze lokalisiert, sondern auch an den Stellen der Septenbildung (Raudaskoski *et al.*, 1988), was auf eine Funktion des Aktins im Spitzenwachstum und der Zellwandbildung schließen lässt. Nur wenig ist bis jetzt über die Regulation des Zytoskeletts in *S. commune* bekannt.

Eine Beteiligung von Ras-Proteinen und dem Rho-Protein Cdc42 am polarem Wachstum konnte in verschiedenen Pilzen nachgewiesen werden. In der Hefe *S. cerevisiae* aktiviert Ras2 über Cdc42 eine MAP-Kinase-Kaskade, die am filamentösem Wachstum beteiligt ist (Mösch *et al.*, 1996). Die Deletion von *CDC42* führt u.a. zum Verlust der Pseudohyphenbildung und einer temperaturabhängigen Zerstörung des Aktin-Zytoskeletts. Die Deletion von *RAS2* führt bei einer Temperaturerhöhung zu einer Delokalisierung von

Cdc42. Es wurde gezeigt, dass Ras eine wichtige Komponente bei der Aufrechterhaltung des Aktinzytoskeletts unter mildem Hitzestress ist (Ho und Bretscher, 2001).

In der Spalthefe *S. pombe* erfolgt die Aktivierung von Cdc42 über Scd1 (GEF von Cdc42) durch das Ras1-Protein. Cdc42 ist in der Lage Shk1, eine Serin/Threonin-Kinase, zu aktivieren (Marcus *et al.*, 1995). Die Deletion von Cdc42 oder Shk1 führt zu einem veränderten polaren Wachstum durch einen Lokalisierungsdefekt von F-Aktin (Ottillie *et al.*, 1995). Ebenfalls wurde gezeigt, dass Scd1 und Shk1 in der Lage sind, direkt mit Mikrotubuli zu interagieren (Li *et al.*, 2000; Qyang *et al.*, 2002). Die Interaktion mit Mikrotubuli wurde allerdings nicht für das polare Wachstum, sondern für die Bildung der Spindel und die Chromosomensegregation gezeigt. In der dimorphen Hefe *C. albicans* kann Cdc42 ebenfalls durch Ras1 aktiviert werden (Feng *et al.*, 1999). Die Regulation des Aktinzytoskeletts und des polaren Wachstums erfolgt u.a. über die Aktivierung des Formins Bni1 durch Cdc42 (Martin *et al.*, 2005). Formine kontrollieren die Assemblierung von F-Aktin in der Zelle. Bni1 in *C. albicans* lokalisiert zusammen mit dem Spitzenkörper in der Hyphenspitze.

Untersuchungen am humanpathogenen Pilz *Penicillium marneffei* haben gezeigt, dass Ras1 die Aktivität von ClfA (Cdc42-Homolog) reguliert und am polarem Wachstum beteiligt ist (Boyce *et al.*, 2005). In dominant negativen RasA-Transformanten kommt es zu einem unpolaren und verzweigten Wachstum der apikalen Zellen. Die subapikalen Zellen von dominant negativen RasA-Mutanten sind angeschwollen und bilden vermehrt Seitenzweige. Dominant negative Cdc42-Mutanten zeigen den gleichen Defekt im polarem Wachstum.

Die Deletion von *ras1* in dem humanpathogenen Pilz *Cryptococcus neoformans* führt u.a. zu einem Defekt des Wachstums bei 37°C, der mit einer Depolarisierung des Aktinzytoskeletts verbunden ist (Alspaugh *et al.*, 2000; Waugh *et al.*, 2002). Die Fähigkeit, bei hohen Temperaturen zu wachsen, wird über Cdc24 vermittelt, dem GEF von Cdc42 (Nichols *et al.*, 2007). Ein Zusammenhang zwischen Ras und Cdc42 im polarem Hyphenwachstum wurde ebenfalls in dem pflanzenpathogenen Pilz *Colletotrichum trifolii* beobachtet (Chen *et al.*, 2006). Die Expression des dominant aktiven Rho-Proteins Cdc42 führt zu einem Verlust des polaren Hyphenwachstums unter Nahrungsmangelbedingungen. Ein ähnlicher Phänotyp konnte in konstitutiv aktiven Ras Mutanten beobachtet werden (Memmott *et al.*, 2002). Durch Zugabe von Prolin ins Medium kann der Wildtyp-Phänotyp wiederhergestellt werden. Die Co-Expression von dominant negativen Cdc42 mit konstitutiv aktiven Ras führt ebenfalls zur Wiederherstellung des Wildtyp-Phänotyps.

Untersuchungen in *S. commune* haben gezeigt, dass Cdc42 an den gleichen Stellen lokalisiert wie Aktin (Weber *et al.*, 2005). Im Wildtyp kann Aktin punktförmig entlang der Hyphe und vermehrt in der Hyphenspitze beobachtet werden. Ebenfalls lokalisiert Aktin als Ring an Stellen der Septenbildung. Untersuchungen von konstitutiv aktivem Cdc42 in *S. commune* haben gezeigt, dass Cdc42 insbesondere am polaren Wachstum in Seitenzweigen beteiligt ist (Weber *et al.*, 2005). Ebenfalls konnte beobachtet werden, dass es zu einer veränderten Lokalisation von Seitenzweigen kommt. Gleichzeitig ist ein isotropes Wachstum in der Nähe von Septen zu beobachten. Daraus lässt sich schließen, dass Cdc42 in *S. commune* an der Lokalisierung und Entwicklung von Verzweigungen beteiligt ist, während das polare Wachstum der Hyphenspitzen nicht beeinträchtigt wurde.

Es konnte also kein Zusammenhang zwischen polarem Spitzenwachstum und dem Rho-Protein Cdc42 in *S. commune* gezeigt werden. Andere Komponenten die am polarem Wachstum beteiligt sind und ebenfalls eine Rolle bei *S. commune* spielen könnten, wurden für verschiedene Pilze beschrieben. In *C. trifolii* wurde die Interaktion von Ras mit der Rho-ähnlichen GTPase Rac1 gezeigt (Chen und Dickman, 2004). Dominant negatives Rac1 führt zum Verlust des Hyphenwachstums und konstitutiv aktives Rac1 zu einem Anschwellen von Hyphen an den Seitenzweigen. Die Expression von dominant aktivem Ras1 und dominant aktiven Rac1 führt zu Wiederherstellung des Wildtyp-Phänotyps.

In *Ustilago maydis* vermittelt Rac1 das filamentöse Wachstum. Die Überexpression von Rac1 führt zu Induzierung von filamentösem Wachstum in haploiden Zellen, während die konstitutive Aktivierung letal ist. Die Deletion von *rac1* resultiert in einem Verlust des Hyphenwachstums (Mahlert *et al.*, 2006). Rac1 scheint eine wichtige Rolle im polarem Wachstum filamentöser Pilze zu spielen, da es nur in diesen Pilzen gefunden wurde (Steinberg und Perez-Martin, 2007).

Im filamentösen Ascomyceten *Ashbya gossypii* wurde der Einfluss der Rho-GTPase Bem2 auf das polare Wachstum gezeigt (Wendland und Philippsen, 2000). Die Deletion von *bem2* führt zu einem isotropen Wachstum mit aufgeblähten Hyphenspitzen. Gleichzeitig kommt es zu einer Depolarisierung von sogenannten Aktin „patches“. Eine Repolarisierung des Aktinskeletts führt zu mehr Stellen von aktivem polarem Wachstum. Desweiteren zeigt die Untersuchung der Ras-ähnlichen GTPase Rsr1 in *A. gossypii* eine Beteiligung an der Ausbildung der Polarität des Aktin-Zytosketts (Bauer *et al.*, 2004). Die Deletion von *rsr1* führt zu einer asymmetrischen Verteilung von Aktin in der Hyphenspitze und somit zu einer Veränderung der Wachstumsrichtung.

Das AlpA-Protein in *Aspergillus nidulans* lokalisiert an Spindelpolkörpern und an den Plus-Enden der Mikrotubuli. AlpA-Deletionsmutanten von *A. nidulans* zeigen einen Verlust des polaren Wachstums und eine vermehrte Ausbildung von Seitenzweigen in älteren Hyphen (Enke *et al.*, 2007).

Untersuchungen des Kinesin-ähnlichen Motorproteins KipA in *A. nidulans* haben gezeigt, dass KipA an der Verankerung der Mikrotubuli in der Hyphenspitze beteiligt ist. Die Mikrotubuli der *kipA*-Deletions-Mutanten erreichen zwar die Hyphenspitze, aber durch die fehlende Verankerung wachsen die Hyphen nicht mehr polar sondern kurvig, vermutlich durch eine Mislokalisierung des Spitzenkörpers im Apex (Konzack *et al.*, 2005).

Desweiteren wurde in *A. nidulans* die Beteiligung von Zellend-Markern am polarem Wachstum gezeigt. Die Deletion von *teaA* und *teaR* führt zu einem Zick-Zack-Wachstum der Hyphen. TeaA vermittelt die Konvergenz der Mikrotubuli in der Hyphenspitze, während TeaR zusammen mit TeaA an der Initiierung des polaren Wachstum und der Aufrechterhaltung des „geradeaus“- Wachstums beteiligt ist. Die polare Lokalisierung von TeaA und TeaB ist dabei abhängig von Sterol-reichen Membrandomänen (Takeshita *et al.*, 2008).

Das ungerichtete polare Wachstum der konstitutiv aktiven Ras1-Mutanten und der Δ gap1-Mutanten in *S. commune* könnte durch wiederholte, kurzzeitige Positionsänderungen des Spitzenkörpers begründet sein. Die Ausbildung des polaren Wachstum ist ein sehr komplexer Vorgang, in dem verschiedene Proteine (z.B. die Motorproteine Kinesin, Dynein und Myosin), der Spitzenkörper und das Zytoskelett selbst beteiligt sind (Fischer 1999; Harris *et al.*, 2005; Steinberg 2007a,b). Für *S. commune* konnte kein Zusammenhang zwischen polarem Spitzenwachstum und dem Rho-Protein Cdc42 gezeigt werden. Die Mikrotubulistränge selbst scheinen nicht die Ursache des veränderten polaren Wachstums zu sein, da sich die Anordnung der Mikrotubulistränge in den konstitutiv aktiven Ras1-Mutanten und Δ gap1-Mutanten nicht vom Wildtyp unterschieden. Die Anordnung der Mikrotubuli in der Hyphenspitze wurde jedoch nicht untersucht. Welche über Ras1 vermittelten Komponenten in *S. commune* am polarem Spitzenwachstum beteiligt sind, ist zum jetzigen Zeitpunkt eher spekulativ und erfordert weitere Untersuchungen. Es bliebe zu untersuchen, ob das Herunterregulieren der Cdc42-Aktivität auch in *S. commune* zum Aufheben der Polaritätsveränderungen in Δ gap1- und konstitutiv aktiven Ras-Mutanten führt und dadurch auch in diesen Pilz eine Beteiligung einer Ras-Cdc42-Signaltransduktion für das Aufrechterhalten der Polarität gezeigt werden könnte.

In den konstitutiv aktiven Ras1-Transformanten von *S. commune* konnten vermehrt Zellen beobachtet werden, die eine erhöhte Anzahl von Seitenzweigen aufwiesen. Ebenfalls wurde die Bildung von Septen an den Verzweigungen beobachtet, jedoch befanden sich keine Zellkerne in den Seitenzweigen. In späteren Stadien kam es zum Absterben dieser Seitenzweige aufgrund der fehlenden Kerne. Untersuchungen des Zytoskeletts zeigten eine normale Ausbildung der Mikrotubulistränge. Dieser Phänotyp konnte nicht in den Δ gap1-Mutanten beobachtet werden. Wie schon erwähnt, ist Cdc42 in *S. commune* nicht primär am polaren Wachstum beteiligt, aber an der Lokalisation und Bildung von Seitenzweigen. Der in den konstitutiv aktiven Ras1-Mutanten beobachtete Effekt der vermehrten Ausbildung von Seitenhyphen könnte also über eine Interaktion von Ras1 mit dem Rho-Protein Cdc42 vermittelt werden.

Eine weiteres Protein, welches an der Ausbildung von Seitenzweigen beteiligt ist, wurde in *A. nidulans* untersucht. Das Septin-Protein AspB lokalisiert premitotisch an Stellen, an denen Seitenhyphen gebildet werden, bevor ein Aktinring und später ein Chitinring ausgebildet wird (Westfall und Momany, 2002). In konstitutiv aktiven Ras1-Mutanten von *S. commune* kommt es zur Ausbildung von Seitenhyphen ohne nachfolgende Kernteilung. Mögliche wäre die Aktivierung eines Seitenhyphen Markers, der durch das aktive Ras1-Protein aktiviert wird. Die fehlende Kernteilung scheint dabei über einen anderen Signalweg reguliert zu werden.

Neben Cdc42 und Septin könnten auch andere Proteine an der Ausbildung vermehrter Seitenzweige in *S. commune* beteiligt sein, z.B führt die Deletion des Rac-Homologen CflB in *P. marneffei* ebenfalls zu einer gesteigerten Bildung von Seitenzweigen bei 25 °C (Boyce *et al.*, 2003). In *A. nidulans* führt die Deletion des Mikrotubuli assoziierten Proteins AlpA zu einer vermehrten Ausbildung von Seitenhyphen (Enke *et al.*, 2007). In *A. gossipii* konnte eine gesteigerte Ausbildung von Seitenzweigen beobachtet werden, die durch eine Mislokalisierung der Polarisom-Komponente Spa2 hervorgerufen wird (Bauer *et al.*, 2004). Weitere Untersuchungen werden notwendig sein, um herauszufinden, welche Komponenten genau an der Ausbildung von Seitenhyphen in den Ras1-Mutanten von *S. commune* beteiligt sind.

Der Phänotyp des Stammes CellT62^{G12V} mit den aufgeblähten Hyphen ähnelt den konstitutiv aktiven Cdc42-Stämmen von *S. commune* (Weber *et al.*, 2005), was auf eine Interaktion von Cdc42 mit Ras1 schließen lässt. Auf CYM-Medium, bei dem der *cell*-Promotor inaktiv ist, konnte dieser Phänotyp nicht beobachtet werden. Keiner der anderen

Transformanten wies blasige Hyphen auf. Es ist damit nicht auszuschließen, dass der Effekt durch das CMC-haltige Medium hervorgerufen wird.

6.2.4 Einfluss von Ras1 auf das Kreuzungsverhalten

Konstitutiv aktive Ras1-Mutanten zeigen in Kreuzungsversuchen mit kompatiblen Wildtyp-Stämmen, eine Veränderung im Kreuzungsverhalten. Obwohl es zu einer normalen Ausbildung von Fruchtkörpern kam, konnte nur auf Seite des Wildtyps die Ausbildung von Schnallen, d.h. die Ausbildung eines Dikaryons, beobachtet werden. Drastischere Effekte zeigten sich bei Kreuzungen von Ras1-Mutanten untereinander. Hier konnte keine Ausbildung von dikaryotischem Myzel und Schnallen beobachtet werden. Es kam auch nicht zur Ausbildung von Fruchtkörpern. Konstitutiv aktive Ras1-Mutanten sind also nicht in der Lage sich sexuell fortzupflanzen.

In Kreuzungen mit Wildtypstämmen wurde beobachtet, dass es nur auf der Seite des Wildtyps zur Ausbildung von Schnallen kommt. Die Ras1-Mutante scheint somit einen Defekt im Kerntransport aufzuweisen. Für den reziproken Austausch von Kernen nach der Verschmelzung zweier kompatibler Hyphen in *S. commune* ist der *B*-Faktor verantwortlich. Wie genau der Kerntransport über den *B*-Faktor vermittelt wird, ist nicht bekannt. Der Kerntransport selbst erfolgt durch Dynein entlang der Mikrotubuli-Stränge. Immunfluoreszenz-Untersuchungen der Mikrotubuli in heterozygoten Dikaryen zeigten ein normal ausgebildetes Mikrotubuliskelett.

Während in *S. cerevisiae* Ras1 und Ras2 keinen Einfluss auf das Kreuzungsverhalten haben (Kataoka *et al.*, 1984), sind in *S. pombe*, *C. neoformans* und *U. maydis* Ras-Proteine an der Regulation der Pheromonantwort beteiligt. In *S. pombe* führt die Deletion von *ras1* zur Sterilität der Hefezellen (Fukui *et al.*, 1986). Haploide Wildtypzellen von *C. neoformans* reagieren auf Pheromone eines Kreuzungspartners, indem die Zellen fusionieren und dikaryotische, filamentöse Hyphen ausbilden, die in der Lage sind Basidiosporen zu bilden. Die Deletion von *ras1* führt dazu, dass nach dem Kontakt mit dem Kreuzungspartner keine Hyphen mehr ausgebildet werden können (Alspaugh *et al.*, 2000; Waugh *et al.*, 2003). Die Deletion von *ras2* in *U. maydis* beeinflusst ebenfalls das Kreuzungsverhalten. In Kreuzungen zweier kompatibler *ras2*-Deletionsmutanten kommt es nicht zur Ausbildung von Luftmyzel, die für die Zellfusion und somit das „mating“

essentiell sind. Die Kreuzung einer Ras2-Mutante mit einem kompatiblen Wildtypstamm zeigt eine stark reduzierte Ausbildung von Konjugationshyphen (Lee und Kronstad, 2002). Damit liegt es nahe, für Ras einen Einfluss auf die Pheromon-vermittelte Signaltransduktion zu fordern.

Zwar konnte ein Einfluss von Ras auf das Kreuzungsverhalten in verschiedenen Pilzen gezeigt werden, doch handelte es sich dort um Deletionsversuche. Trotzdem scheint in *S. commune* die konstitutive Aktivierung von Ras1 einen Einfluss auf das Kreuzungsverhalten zu haben.

6.2.5 Beeinflussung der Fruchtkörperentwicklung

In der $\Delta gap1$ -Deletionsmutante von *S. commune* wurde ein Phänotyp mit verzögerter Schnallenfusion und deformierter Schnallenbildung beschrieben, der ebenfalls vom *B*-Faktor abhängt. Hier müsste untersucht werden, ob der $\Delta gap1$ -Phänotyp durch Überexpression der *B*-Gene komplementiert werden kann. Es wäre denkbar, dass Ras auf die Expression der Pheromone und Rezeptoren des *B*-Faktors im Dikaryon einwirkt, so dass eine Pheromon-vermittelte Schnallenfusion gestört ist. Kompatible $\Delta gap1$ -Stämme waren in der Lage, ein Dikaryon auszubilden, zeigen aber einen Defekt in der Fruchtkörperentwicklung (Schubert *et al.*, 2006). Die Fruchtkörper der $\Delta gap1/\Delta gap1$ -Dikaryen zeichnen sich durch schwach ausgebildete Lamellen aus, die teilweise vollständig fehlten. Die Mikrotomschnitte der Primordien zeigten eine veränderte Ausbildung des Hymeniums. Die apikalen Zellen des Hymeniums waren im Gegensatz zum Wildtyp verdickt und auch unregelmäßiger angeordnet. Die Mutante ist in der Lage, Basidien auszubilden, in denen die Verschmelzung der beiden Zellkerne stattfindet, doch erfolgt danach keine Meiose und somit keine Ausbildung von Basidiosporen.

In *S. cerevisiae* wurden zwei antagonistische Effekte von Ras/cAMP im Zusammenhang mit dem Zellzyklus beschrieben. Durch Glukosezufuhr wird der cAMP-Spiegel in der Zelle erhöht, was zur Aktivierung der Cycline Cln1 und Cln2 führt. Cln3 dagegen wird abhängig von der Nahrungsquelle und unabhängig von cAMP reguliert. Durch die gleichzeitige Aktivierung von Cln1 und Cln2 durch cAMP und Cln3, kommt es zum Eintritt der Zelle in die S-Phase. Bei einem Wechsel der Nahrungsquelle von nichtfermentierbarem Kohlenstoff zu Glukose steigt der cAMP-Gehalt in der Zelle

ebenfalls an. Dabei kommt es nicht zur Aktivierung von Cln3 und damit auch nicht zur Aktivierung von Cln1 und Cln2. Dadurch bleibt die Zelle in der G1-Phase stehen bis sie eine gewisse Zellgröße erreicht hat (Wittenberg und Read, 1996). Durch Aktivierung von Ras1 kommt es zu einer Erhöhung des cAMP-Spiegels. Analog könnte in *S. commune* durch erhöhte Ras1-Aktivität ein erhöhter cAMP-Spiegel vorliegen, der damit zu einer Verhinderung der Meiose führt.

Die Kreuzung konstitutiv aktiver Ras1-Stämme von *S. commune* mit kompatiblen Wildtypstämmen führte zur Ausbildung von normalen Fruchtkörpern. Es kam zur Bildung von Sporen, doch zeigten die Sporen einen Defekt in ihrer Keimungsrate. Abhängig von der Kreuzung konnte eine Verminderung der Sporenkeimung um bis zu 60 % gegenüber dem Wildtyp beobachtet werden. Auffallend bei den heterozygoten Kreuzungen war ebenfalls, dass weniger als 10 % der ausgekeimten Sporen einen veränderten Phänotyp zeigten. Nicht nur in *S. commune* konnte ein Einfluss von Ras auf die Bildung und Keimung von Sporen beobachtet werden.

In konstitutiv aktiven Ras-Stämmen in *C. trifolii* konnte nicht nur die Änderung des polaren Hyphenwachstums beobachtet werden, sondern auch der Verlust der Sporenbildung (Memmot *et al.*, 2002). Dominant negatives Ras hingegen führte zu einer Verminderung der Sporenkeimung (Ha *et al.*, 2003). In *A. fumigatus* sind die Gene *rasA* und *rasB* an der asexuellen Entwicklung beteiligt (Fortwendel *et al.*, 2003). Konstitutiv aktives RasA führt zu einer Verringerung der Konidienbildung, während dominant negatives RasA zu einer verringerten Konidienkeimung führt. Die konstitutive Aktivierung von RasB führt ebenfalls zu einer Verringerung der Konidienbildung, die jedoch nicht so stark ausgeprägt ist wie bei der RasA-Mutante. Die dominant negative RasB-Mutante zeigt eine verzögerte Konidienkeimung. In *P. marneffeii* führt die Aktivierung von RasA zur Reduktion der Konidienbildung (Boyce *et al.*, 2005).

Sowohl die konstitutive Aktivierung von Ras1 als auch die Deletion von *gap1* in *S. commune* führen zu einer gesteigerten Aktivität des Ras-Proteins. Die Mutanten zeigten unterschiedliche, aber auch überlappende Phänotypen. Es zeigten sich auch Unterschiede und Gemeinsamkeiten zu konstitutiv aktiven Ras-Stämmen des Basidiomyceten *C. cinerea* (Kües, unveröffentlicht). Ras^{val19} Stämme von *C. cinerea* zeigen wie die konstitutiven Ras1- und Δ gap1-Stämme von *S. commune*, ein verringertes Wachstum auf Festmedium und einen Verlust des polaren Hyphenwachstums. Ras^{val19}-Stämme von *C. cinerea* zeigen

eine veränderte Schnallenbildung und Fruchtkörperbildung, wie die $\Delta gap1$ -Mutanten von *S. commune*, sind aber im Gegensatz zu *S. commune* in der Lage, Basidiosporen auszubilden. Ebenfalls bilden die Ras^{val19}-Stämme von *C. cinerea* vermehrt Seitenhyphen aus, wie die konstitutiv aktiven Ras1-Mutanten von *S. commune*.

Eine mögliche Erklärung der Unterschiede in den Phänotypen könnte sein, dass Gap1 nicht das Ras-Protein reguliert, das hier untersucht wurde. Die Suche nach orthologen Genen in verschiedenen Pilzen ergab, dass alle Pilze zwei bis vier Orthologe zu Gap1 besitzen (Schubert *et al.*, 2006). Es konnten vier Gruppen von Ras-GAPs erkannt werden, die sich voneinander durch ihre Größe und ihre funktionellen Domänen unterscheiden. Durch die Analyse bekannter pilzlicher Genome schlussfolgern Schubert *et al.* (2006), dass *gap1* in nur einer Kopie im Genom vorliegt und dass zwei weitere Ras-GAPs unterschiedlicher Struktur exprimiert werden. Die durchgeführten Southern-Blot-Analysen und PCRs gaben jedoch keinen Hinweis auf eine weitere Kopie von *gap1* im Genom von *S. commune*.

An der Regulation von Ras sind neben den GAP-Proteinen auch GEF-Proteine beteiligt. Bei *S. pombe* wird die Aktivität von Ras1 über die GEFs Ste6 und Efc25 reguliert. Ste6 wird bei Stickstoffmangel aktiviert und reguliert über die Aktivierung von Ras1 eine MAP-Kinase-Kaskade, die die sexuelle Erkennung, Sporulation und Konjugation reguliert. Die Aktivierung von Ras1 über Efc25 führt zur Regulation des Zytoskeletts (Papadaki *et al.*, 2002).

Eine weitere Möglichkeit könnte das Vorhandensein eines weiteren Ras Gens in *S. commune* sein. Sowohl *C. neoformans* als auch *U. maydis* besitzen jeweils zwei Ras-Gene. In *C. neoformans* übernimmt ein Ras-Protein, Ras1, die Hauptaufgaben bei der Regulation von Kreuzungsverhalten, Fruchtkörperbildung und Wachstum. Die Deletion von *ras2* zeigt keinen sichtbaren Phänotyp und die Expression von *ras2* liegt deutlich unter den von *ras1* (Alspaugh *et al.*, 2000, Waugh *et al.*, 2002 und 2003). In *U. maydis* haben Ras1 und Ras2 teilweise überlappende Funktionen (Lee und Kronstad, 2002; Müller *et al.*, 2003). Ob in *S. commune* ein zweites Ras-Gen vorhanden ist, könnte nach Abschluß des Sequenzierungsprojekts geklärt werden.

Eine konstitutiv aktive Ras1-Mutante (Ras^{Q61L}) in *S. commune* wurde ebenfalls von Yamagishi *et al.* (2004) untersucht. Ein Vergleich zwischen dem untersuchten *ras1*-Gen

von Yamagishi *et al.* und dem *ras1* der vorliegenden Arbeit, zeigte eine 100 %ige Übereinstimmung in der Sequenz. Ras^{Q61L}-Monokaryen der Stämme von Yamagishi *et al.* zeichnen sich durch eine um 40 % im Vergleich zum Wildtyp reduzierte Wachstumsrate aus. In Dikaryen konnte dagegen keine Veränderung in der Wachstumsrate beobachtet werden. Expressionsuntersuchungen ergaben, dass Ras^{Q61L} in Monokaryen und Dikaryen niedriger exprimiert wird als im Wildtyp. Es konnte keine Veränderung des cAMP-Spiegels in konstitutiv aktiven Ras^{Q61L}-Stämmen gemessen werden. Ebenfalls kommt es in der Mutante zu einer eingeschränkten Ausbildung von Fruchtkörpern. Es wurden jedoch keine Aussagen über mikroskopische Untersuchungen zur Hyphenstruktur oder den Aussehen der Fruchtkörper gemacht. Eine mögliche Erklärung für unterschiedlichen Phänotypen zu *Δgap1*-Stämmen und den konstitutiv aktiven Ras-Stämmen aus der vorliegenden Arbeit, liegt vermutlich an der Versuchsdurchführung. In den untersuchten Stämmen war das *ras*^{Q61L}-Allel ektopisch unter der Kontrolle des Promotors des Hydrophobin Gens *sc3* aus *S. commune* ins Genom integriert worden. Es ist bekannt, dass Sc3 im Monokaryon und Dikaryon stark exprimiert wird, aber in den Fruchtkörpern stark eingeschränkt ist (Mulder und Wessel, 1986). Weitere Untersuchungen von Sc3 haben gezeigt, dass bei der Transformation einer zusätzlichen Kopie des *sc3* Gens, ein Abschaltungs-Effekt („silencing“) auftritt. 90 % der Transformanten exprimieren weder das endogene noch das eingefügte *sc3* Gen (Schuurs *et al.*, 1997). Eine Transformation des *sc3* Gens alleine, ohne dessen Promotor, reduziert die Anzahl der „silencing“-Ereignisse. Die unterschiedlichen Effekte bei Yamagishi *et al.* (2004) könnten auf ein „silencing“-Ereignis zurückzuführen sein durch die Verwendung des Sc3-Promotors. Ein einfacher Test dieser Hypothese wäre die Untersuchung der *ras*^{Q61L}-Mutanten auf Medium mit 5-Azacytidin. Schuurs *et al.* (1997) konnten zeigen, dass die Zugabe von 5-Azacytidin die Methylierung der DNA und somit das „silencing“ verhindert.

6.2.6 Ras1 und cAMP / PKA-Signaltransduktion

Der Phänotyp in der Fruchtkörperbildung der *Δgap1/Δgap1*-Mutanten bezüglich der Lamellen- und Sporenbildung ist bereits von Schwalb (1974) beschrieben worden. Schwalb beobachtete, dass die Zugabe von cAMP in einer frühen Entwicklungsphase, zu einer fehlenden oder veränderten Ausbildung von Lamellen kommt. Viele Fruchtkörper stellten ihre Entwicklung zudem in einem frühen Entwicklungsstadium, zu Beginn der Primordienbildung, ein. Die beschriebene *bse*-Mutante von *S. commune* mit lamellenlosen

Fruchtkörpern weist eine erhöhte cAMP-Konzentrationen im vegetativen Myzel und in den Fruchtkörpern auf (Schwalb, 1978).

Untersuchungen von Dubovoy und Muñoz (1979) mit Caffein zeigten einen Einfluss auf die Entwicklung von Schnallen in Dikaryen von *S. commune*. Caffein inhibiert die Phosphodiesterase, wodurch der Abbau von cAMP in der Zelle reduziert wird. Durch Zugabe von 1 mg/ml Kaffeein kam es in über 90 % der Dikaryen zur Ausbildung von Pseudoschnallen. Pseudoschnallen treten bei inkompatiblen Kreuzungen auf, in dem der A-Weg angeschaltet ist ($A \neq B =$). Bei Erhöhung des Caffeins auf 2,5 mg/ml tritt sogar der völlige Verlust an Schnallen auf. Es konnte keine weitere Veränderung des Phänotyps in den Monokaryen beobachtet werden. Die Morphologie der reifen Fruchtkörper wurde in dieser Arbeit nicht erwähnt.

Konstitutiv aktive Ras1-Mutanten in *S. commune* sind nicht in der Lage Dikaryen auszubilden, was an einem zu hohen intrazellulären cAMP-Spiegel, wie bei Dubovoy und Muñoz (1979) beschrieben, liegen könnte. Obwohl die Menge von cAMP in den Ras1 und Δ gap1-Mutanten nicht bestimmt werden konnte, lassen sich durch die nachgewiesene Aktivierung der PKA Rückschlüsse auf den cAMP-Gehalt schließen. Die Δ gap1-Stämme zeigten gegenüber den Ras1-Mutanten eine nicht so hohe PKA-Aktivität, und somit vermutlich einen geringeren intrazellulären cAMP-Spiegel als die Ras1-Mutanten. Die unterschiedliche Aktivierung der PKA der Mutanten und der damit unterschiedliche cAMP-Spiegel könnte eine Auswirkung auf die Dikaryonbildung der Δ gap1-Mutanten und der konstitutiv aktiven Ras1-Mutanten haben. In den Δ gap1-Stämmen kommt es zwar nicht zu Ausbildung von Pseudoschnallen durch Erhöhung des cAMP-Spiegels, aber die Bildung von Schnallen ist gegenüber dem Wildtyp verändert (Schubert *et al.*, 2006).

Auch in anderen Pilzen konnte ein Zusammenhang zwischen dem intrazellulären cAMP-Gehalt und der Fruchtkörperentwicklung gezeigt werden. In *C. cinerea* wurde ein durch Licht ausgelöster Anstieg des intrazellulären cAMP-Levels während der Fruchtkörperbildung gezeigt, der durch eine Aktivierung der Adenylatzyklase erfolgt. Der maximale cAMP-Gehalt wurde dabei in den Vorstufen der Primordien und in den Fruchtkörperinitialen gemessen. Im weiteren Verlauf der Fruchtkörperbildung sank der cAMP-Gehalt wieder (Uno *et al.*, 1974; Moore, 1998). In *L. edodes* ist der cAMP-Gehalt in den Primordien am höchsten und am geringsten im monokaryotischen Myzel. Dazwischern erreicht der cAMP-Spiegel einen Mittelwert (Takagi *et al.*, 1988).

Kinoshita *et al.* (2002) untersuchten den intrazellulären cAMP-Gehalt während der Fruchtkörperentwicklung in *S. commune*. Nach dem Wechsel von 30°C und dunkel zu 20°C und Licht konnte eine rapide Abnahme des cAMP-Gehalts in der Zelle gemessen werden, der danach jedoch wieder zunimmt. Der maximale cAMP-Gehalt wird vor der Primordienbildung erreicht und schwankt danach bis zur letzten Phase der Fruchtkörperentwicklung. Dabei konnte beobachtet werden, dass der cAMP-Gehalt über das ganze Myzel gleich verteilt war. Desweiteren ergaben Untersuchungen mit Caffein, dass die externe Zugabe zu einer Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels führt, die mit einer Erhöhung in der Zahl der gebildeten Fruchtkörperinitialen und Primordien zusammenhängt. Die Untersuchung reifer Fruchtkörper wurde in der Arbeit von Kinoshita *et al.* (2002) ebenfalls nicht gezeigt.

Die Untersuchungen der PKA-Aktivität zeigt einen starken Anstieg in den konstitutiv aktiven Ras1-Mutanten und $\Delta gap1$ -Stämmen von *S. commune* im Vergleich zum Wildtyp, der vermutlich durch eine Steigerung des intrazellulären cAMP-Spiegels hervorgerufen wurde. Neben *S. cerevisiae* (Toda *et al.*, 1985) konnte auch in den Basidiomyceten *C. neoformans* (Alspaugh *et al.*, 2000) und *U. maydis* (Müller *et al.*, 2003) eine Aktivierung der cAMP/PKA-Wegs durch Ras nachgewiesen werden. Die Beobachtungen in den Ras1- und $\Delta gap1$ -Mutanten deuten somit auf eine über Ras/cAMP/PKA gesteuerte Fruchtkörperentwicklung in *S. commune* hin. Nicht alle beobachteten Phänotypen der konstitutiv aktiven Ras1- und $\Delta gap1$ -Mutanten lassen sich aber durch einen veränderten cAMP Spiegel erklären, so wird die Veränderungen im polarem Wachstum der Hyphen und die Ausbildung vermehrter Seitenzweige nicht über den cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg vermittelt. Dieses Ergebnis deckt sich mit der Arbeit von Schwalb (1974) und Dubovoy und Muñoz (1979), die keine Änderungen in vegetativem Wachstum nach externer Zugabe von cAMP bzw. Caffein beobachteten konnten.

6.3 Die chromosomale Struktur von *tpk*

Da sich eine Signaltransduktion Ras/cAMP/PKA zeigte, wurde die katalytische Untereinheit der PKA untersucht. Die Isolierung des Gens für die katalytische Untereinheit der PKA erfolgte über Koloniehybridisierung und TAIL-PCR. Es konnte die gesamte genomische Sequenz des Gens bestimmt werden. Das *tpk*-Gen besitzt eine Länge von 1393 bp, mit einem ORF von 1277 bp, der durch zwei Introns von 58 und 55 bp unterbrochen

wird. Die Sequenz der Introns im Bereich der Spleißstellen sowie der internen Sequenz für die Ausbildung der Lariatstruktur weisen nur geringe Abweichungen zu der für *S. commune* bestimmten Konsensussequenz auf (Abb. 6.2). Das davon abgeleitete Protein setzt sich aus 423 Aminosäureresten zusammen. Zusätzlich enthält das Fragment einen 5'-Bereich von 1413 bp und einen 3'-Bereich von 330 bp.

Der 5'-Bereich enthält vermutlich den gesamten Promotorbereich, obwohl typische Promotorelemente wie die TATA-Box und die CAAT-Box nicht genau nachgewiesen werden können. Um das zu belegen, müsste eine Analyse des Promotors erfolgen. Ein für Eukaryoten typisches Polyadenylierungssignal im 3'-Bereich (AAUAAA, Wahle, 1992) ist nicht zu erkennen.

	5'-Ende	Lariat	3'-Ende	Länge
Intron1	GTGCGT	TGCTTAT	CAG	58 bp
Intron 2	GTGCGT	TGCTGAT	CAG	55 bp
Konsensus	GTRAGT	YRCTRAY	YAG	

Abb. 6.2: Konservierte Intronsequenzen des Genfragments *tpk*

Angegeben sind die konservierten Sequenzen im 5'- und 3'- Spleißbereich der Introns, die interne Konsensussequenz, sowie die Länge der Introns. Als Vergleich wurde die bisher ermittelte Konsensussequenz (Konsensus) aus den Genen für Introns aus *S. commune* angegeben (R=A/G, Y=C/T).

Der chromosomale GC-Gehalt in *S. commune* liegt wie schon erwähnt, bei etwa 57±6 % (Dons *et al.*, 1979). Das Gen *tpk* weist in seiner kodierenden Region einen GC Gehalt von 61 % auf und liegt somit im Normalbereich für durchschnittlich bis schwächer exprimierte Gene.

Durch die Überprüfung des Codongebrauchs konnte *tpk* mit einem nicht eingeschränkten Codongebrauch (56 von 61 möglichen Codons) als gering exprimiertes Gen klassifiziert werden (Schuren, 1992).

Untersuchungen der Expression von *tpk* durch quantitative Real-Time PCR haben gezeigt, das *tpk* genauso wie *ras1* ein niedrig exprimiertes Gen im Vergleich zu *tefl* und *28S* ist. Die Expressionswerte von *tpk* in den konstitutiv aktiven *ras1*- und *Δgap1*-Mutanten unterscheiden sich nicht gegenüber dem Expressionsniveau der Wildtypstämme. Es konnte also kein Einfluss von Ras1 auf die Expression von Tpk nachgewiesen werden. Die

Aktivität von Tpk in der Zelle wird aber nicht durch die Menge des Proteins bestimmt, sondern durch die Bindung von cAMP an die regulatorischen Untereinheiten der PKA und der darauf folgenden Freisetzung der aktiven katalytischen Untereinheiten. Um eine Aussage zur Expression von Tpk in verschiedenen Lebenszyklen von *S. commune* zu machen, müssten weitere Untersuchungen erfolgen.

Die abgeleitete Aminosäuresequenz von Tpk ergab Übereinstimmungen mit mehreren katalytischen Untereinheiten von cAMP-abhängigen Proteinkinasen A. Die größte Übereinstimmung gab es mit *Laccaria bicolor* (67 %), *Ustilago maydis* (65 %), *Cryptococcus neoformans* (65 %) und *Aspergillus fumigatus* (57 %).

Wichtige funktionelle Sequenzabschnitte konnte man durch Sequenzvergleich von *tpk* aus *S. commune* mit katalytischen Untereinheiten der PKA aus verschiedenen Organismen bestimmen. Wichtige Motive sind das RDLKPEN-Motiv der katalytischen Schleife, das GTGSFK-Motiv, welches an der Nukleotidbindung beteiligt ist, sowie das DFGFAK-Motiv, welches an der Mg²⁺-Bindung beteiligt ist. Eine weitere funktionelle Einheit bilden die Aminosäuren L266, P270 und L273, die phosphoryliert werden (Knighton *et al.*, 1991).

Da bekannt ist, dass verschiedene Pilze mehr als eine katalytische Untereinheit der PKA besitzen, sollte mit einer Southern-Blot-Hybridisierung überprüft werden, ob das Gen *tpk* ebenfalls in mehreren Orthologen im Genom von *S. commune* vorliegt. Das Ergebnis zeigt, dass mindestens ein weiteres homologes Gen in *S. commune* vorliegt. Während der Untersuchungen zu *tpk* aus *S. commune* wurden von einer anderen Arbeitsgruppe zwei Gene isoliert (*ScPka1*, *ScPka2*), die jeweils für eine katalytische Untereinheit der PKA kodieren (Yamagishi *et al.*, 2005). Sequenzvergleiche zeigten, dass *tpk* zu 97 % Übereinstimmung mit *ScPka1* zeigt. Obwohl die Übereinstimmung von *tpk* mit *ScPka1* nicht 100 % ist, ist anzunehmen, dass es sich um das gleiche Protein handelt. Untersuchungen zur Funktion der katalytischen Untereinheiten der PKA wurden von Yamagishi *et al.* (2005) durchgeführt. Die Untersuchung erfolgte durch ektopische Transformation der Gene *ScPka1* und *ScPka2* ohne ihre aktiven katalytischen Domänen unter Regulation des Sc3-Promotors. In weiteren Untersuchungen wurden die Klone verwendet, die das mutierte Gen stark exprimieren. Jedoch wurde nach Kreuzungen mit einem Wildtypstamm das mutierte Gen nicht mehr exprimiert. ScPka-Mutanten zeigten eine stark eingeschränkte Bildung von Luftmyzel. Wie schon erwähnt, kann die Verwendung des Sc3-Promotors von *S. commune* zu „silencing“ Ereignissen führen, d.h.

zu Verlust der Genexpression. Die Verminderung des Luftmyzels könnte auch auf den Sc3-Promotor zurückzuführen sein, da bekannt ist, dass die Deletion von *sc3* zu einem Verlust des Luftmyzels in *S. commune* führt (Wessels *et al.*, 1991). Besser geeignet wäre die Untersuchung der katalytischen Untereinheiten durch Deletion der Gene oder einem gezielten RNAi.

Im Vergleich mehrerer Pilze wurde gezeigt, dass die katalytischen Untereinheiten der PKA unterschiedliche Funktionen erfüllen können. In der Hefe *S. cerevisiae* wurde gezeigt, dass Tpk1 und Tpk3 an der negativen Regulierung des filamentösen Wachstums beteiligt sind, möglicherweise durch eine Rückkopplung, die die cAMP-Produktion inhibiert. Tpk2 hingegen reguliert das filamentöse Wachstum positiv (Robertson und Fink, 1998). In *C. neoformans var. grubii* ist die katalytische Untereinheit Pka1 an der Ausbildung von Melanin, der Kapsel und an der Kreuzung beteiligt, während die Pka2 keinen Einfluss drauf zeigt (Hicks *et al.*, 2004). In *C. neoformans var. neoformans* ist die jedoch die Pka2 an der Ausbildung von Melanin, der Kapsel und an der Kreuzung beteiligt und nicht die Pka1. In *U. maydis* führt die Deletion der katalytischen Untereinheit *adr1* zu einem konstitutiv filamentösen Phänotyp. Die Deletion der zweiten katalytischen Untereinheit, *uka1*, hat keinen Effekt auf die Zellmorphologie und ist nur gering an der Pathogenität beteiligt (Dürrenberger *et al.*, 1998). Welche Funktion Tpk, bzw. ScPka1 und ScPka2 in *S. commune* erfüllen, könnte durch nachfolgende Untersuchen, wie die Deletion der Gene, näher bestimmt werden.

6.4 Aktivitätsbestimmung von *tpk*

Expressionsuntersuchungen von *tpk* mittels quantitativer Real-Time-PCR haben gezeigt, dass *tpk* in konstitutiv aktiven Ras1-Stämmen und *Δgap1*-Stämmen im Vergleich zum Wildtyp nicht unterschiedlich exprimiert wird. Untersuchungen der Aktivität der PKA zeigten jedoch, das aktives Ras1 einen Einfluss auf die PKA hat. Es kam zu einer deutlich erhöhten Aktivität der PKA in den konstitutiv aktiven Ras1 Stämmen und *Δgap1*-Stämmen im Vergleich zum Wildtyp. Somit zeigt sich eine Beteiligung von Ras1 im cAMP/PKA-Weg in *S. commune*.

Durch Untersuchungen in anderen Pilzen ist bekannt, dass die Aktivierung des cAMP/PKA-Wegs auch ohne Ras-Proteine erfolgen kann. Die Aktivierung der

Adenylatzyklase erfolgt hierbei über einen G-Protein gekoppelten Rezeptor und eine G α -Untereinheit eines heterotrimeren G-Proteins. Dass es eine Aktivierung des cAMP-Weges unabhängig von Ras1 in *S. commune* gibt, wurde von einer anderen Arbeitsgruppe gezeigt (Yamagishi *et al.*, 2002 und 2004). Die Expression der konstitutiv aktiven G α -Untereinheiten ScGP-A und ScGP-C führte zu einer Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels in den Mutanten. Also kann der cAMP/PKA-Weg in *S. commune* über zwei Signale aktiviert werden. Das gleiche wurde u.a. gezeigt für *S. cerevisiae* (Kraakman *et al.*, 1999; Thevelein und de Winde, 1999), *C. albicans* (Maidan *et al.*, 2005), *C. neoformans* (Wang, Heitman, 1999) und *U. maydis* (Kahman *et al.*, 1999).

6.5 Ausblick

In dieser Arbeit konnte ein Zusammenhang zwischen konstitutiv aktiven Ras1 und der sexuellen Entwicklung in *S. commune* gezeigt werden. Dabei wurde gezeigt, dass Ras1 in mehrere Signalwegen involviert ist. Die Entwicklung der Fruchtkörper wird über einen Ras/cAMP/PKA-Weg reguliert. Die Bildung von Seitenhyphen wird vermutlich über das Rho-Protein Cdc42 vermittelt (Weber *et al.*, 2005). Ein Zusammenhang zwischen B-regulierter Entwicklung und Ras1 konnte ebenfalls gezeigt werden. Wie der Signalweg von Ras1 über den das polare Wachstum vermittelt wird ist nicht bekannt. Diese unterschiedlichen Signaltransduktionswege sollten weiter untersucht werden, um so die verschiedenen Effektorproteine der sexuellen Vermehrung zu identifizieren. Das Modellsystem *S. commune* erlaubt dabei besonders gut die morphologischen Veränderungen an Schnallen oder in Fruchtkörpern zu untersuchen. Erste Untersuchungen zur cAMP-abhängigen Signaltransduktion wurden hier mit der Charakterisierung von *tpk* vorgelegt. Weitere Untersuchungen müssen diese Daten unterstützen.

Wichtig wäre weiterhin die Untersuchung einer Deletionsmutante oder einer RNAi-Mutante („silencing“) von Ras1 um zu klären, ob es sich bei *ras1* zweifelsfrei um ein essentielles Gen handelt. Ebenfalls müsste geklärt werden, ob die dominant negative Mutation von Ras1 funktionstüchtig oder letal ist. Sinnvoll wäre auch die Untersuchung weiterer GAP- und GEF-Proteine und deren Beteiligung an der Regulation von Ras1 in der Zelle. Dies wird mit der Veröffentlichung der Genomsequenz von *S. commune* erleichtert werden. Weitere interessante Arbeitsgebiete ergeben sich aus den hier vorgelegten Studien. Expressionsuntersuchungen von *ras1* unter verschiedenen Stresssituationen sollten zeigen, ob beispielsweise die stressinduzierte Fruchtkörperbildung

mit einer Expressionsänderung von Ras1 einhergeht. Die Untersuchung des Aktinzytoskeletts durch Immunfluoreszenz könnten Hinweise auf einen Einfluss von Ras1 auf das polare Hyphenwachstum in *S. commune* liefern. Die Untersuchung von Cdc42- und Ras1-Doppelmutanten könnten einen näheren Einblick in die Ras1 vermittelte Signaltransduktion zeigen. Ebenso könnte die Untersuchung der PKA-Aktivität in Dynein- $\Delta dhc2$ -Mutanten (Schubert, unveröffentlicht) und Cdc42-Mutanten Hinweise auf die Ras/cAMP-vermittelte Signaltransduktion zeigen. Für die Untersuchung der Funktion der katalytischen Untereinheiten der PKA in der sexuellen Entwicklung von *S. commune* wäre es sinnvoll Deletionsmutanten herzustellen. Die Regulation durch die regulatorische Untereinheit wäre ebenfalls zu überprüfen.

Wie sich gezeigt hat, ist *S. commune* nicht nur geeignet, die phänotypischen Veränderungen in der sexuellen Entwicklung zu untersuchen, sondern auch die molekularbiologischen Grundlagen dieser Veränderungen zu studieren.

7. Literatur

- Alspaugh, J.A., Perfect, J.R. und Heitman, J. (1997). *Cryptococcus neoformans* mating and virulence are regulated by the G-protein alpha subunit GPA1 and cAMP. *Genes Dev.* 11, 3206-3217.
- Alspaugh, J.A., Perfect, J.R. und Heitman, J. (1998). Signal transduction pathways regulating differentiation and pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. *Fungal Genet. Biol.* 25, 1-14.
- Alspaugh, J.A., Cavallo, L.M., Perfect, J.R. und Heitman, J. (2000). RAS1 regulates filamentation, mating and growth at high temperature of *Cryptococcus neoformans*. *Mol. Microbiol.* 36, 352-365.
- Alspaugh, J.A., Pukkila-Worley, R., Harashima, T., Cavallo, L.M., Funnell, D., Cox, G.M., Perfect, J.R., Kronstad, J.W. und Heitman, J. (2002). Adenylyl cyclase functions downstream of the G α protein Gpa1 and controls mating and pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot. Cell* 1, 75-84.
- Altschuler, D.L., Muro, A., Schijman, A., Almonacid, F.B. und Torres, H.N. (1990). *Neurospora crassa* cDNA clones coding for a new member of the *ras* protein family. *FEBS Lett.* 273, 103-106.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, E.R., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (1999). Short protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, New York.
- Banno, S., Ochiai, N., Noguchi, R., Kimura, M., Yamaguchi, I., Kanzaki, S., Maruyama, T. und Fujimura, M. (2005). A catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase, PKAC-1, regulates asexual differentiation in *Neurospora crassa*. *Genes Genet. Syst.* 80, 25-34.
- Bartnicki-Garcia, S. und Lippman, E. (1969). Fungal morphogenesis: Cell wall construction in *Mucor rouxii*. *Science* 165, 302-304.
- Bartnicki-Garcia, S., Bartnicki, D.D., Gierz, G., Lopez-Franco, R. und Bracker, C.E. (1995). Evidence that Spitzenkörper behavior determines the shape of a fungal hypha. A test of the hyphoid model. *Exp. Mycol.* 19, 153-159.
- Bauer, Y., Knechtle, P., Wendland, J., Helfer, H. und Philippsen, P. (2004). A Ras-like GTPase is involved in hyphal growth guidance in the filamentous fungus *Ashbya gossypii*. *Mol. Biol. Cell* 15, 4622-4632.
- Benčina, M., Panneman, H., Ruijter, G.J.G., Legiša M. und Visser, J. (1997). Characterization and overexpression of the *Aspergillus niger* gene encoding the cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit. *Microbiology* 143, 1211-1220.
- Birnboim, H.C. und Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* 7, 1513-1523.
- Bluhm, B.H., Zhao, X., Flaherty, J.E., Xu, J. und Dunkle, L.D. (2007). RAS2 regulates growth and pathogenesis in *Fusarium graminearum*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 20, 627-636.
- Bockmühl, D., Krishnamurthy, S., Gerads, M., Sonneborn, A. und Ernst, J.F. (2001). Distinct and redundant roles of the two protein kinase A isoforms Tpk1p and Tpk2p in morphogenesis and growth of *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* 42, 1243-1257.
- Bos, J.L. (1989). Ras oncogenes in human cancer. *Cancer Res.* 49, 4682-4689.
- Boyce, K.J., Hynes, M.J. und Andrianopoulos, A. (2003). Control of morphogenesis and actin localization by the *Penicillium marneffei* RAC homolog. *J. Cell. Biol.* 116, 1249-1260.
- Boyce, K.J., Hynes, M.J. und Andrianopoulos, A. (2005). The Ras and Rho GTPases genetically interact to co-ordinately regulate cell polarity during development in *Penicillium marneffei*. *Mol. Microbiol.* 55, 1487-1501.

- Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Bruno, K.S., Aramayo, R., Minke, P.F., Metzenberg, R.L. und Plamann, M.** (1996). Loss of growth polarity and mislocalization of septa in a *Neurospora* mutant altered in the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. *EMBO J.* 15, 5772-5782.
- Busby, S. und Ebricht, R.H.** (1994). Promoter structure, promoter recognition, and transcription activation in prokaryotes. *Cell* 79, 743-746.
- Calvin, N.M. und Hanawalt P.C.** (1988). High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *J. Bacteriol.* 170(6), 2796-2801.
- Casselton, L.A.** (1978). Dikaryon formation in higher basidiomycetes. In: „*The filamentous Fungi, Developmental Mycology*“ (Smith, J.E. and Berry, D.R., Hrsg.) Bd.3, 275-297. Edward Arnold, London.
- Cassola, A., Parrot, M., Silberstein, S., Magee, B.B., Passeron, S., Giasson, L. und Cantore, M.L.** (2004). *Candida albicans* lacking the gene encoding the regulatory subunit of protein kinase A displays a defect in hyphal formation and an altered localization of the catalytic subunit. *Eukaryot. Cell* 3, 190-199.
- Cenis, J.L.** (1992). Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucl. Acids Res.* 20, 2380.
- Chen, C. und Dickman, M.B.** (2004). Dominant active Rac and dominant negative Rac revert the dominant active Ras phenotype in *Colletotrichum trifolii* by distinct signalling pathways. *Mol. Microbiol.* 51, 1493-1507.
- Chen, C., Ha, Y., Min, J., Memmott, S.D. und Dickman, M.B.** (2006). Cdc42 is required for proper growth in the fungal pathogen *Colletotrichum trifolii*. *Eukaryot. Cell* 5, 155-166.
- D'Souza, C.A., Heitman, J.** (2001). Conserved cAMP signaling cascades regulate fungal development and virulence. *FEMS Microbiol. Rev.* 25, 349-364.
- Dons, J.J.M., De Vries, O.M.H. und Wessels, J.G.H.** (1979). Characterization of the genome of the basidiomycete *Schizophyllum commune*. *Biochem. Biophys. Acta.* 563, 100-112.
- Dower, W.J., Miller, J.F. und Ragsdale, C.W.** (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucl. Acids Res.* 16 (13), 6127-6143.
- Dubovoy, C. und Muñoz, A.** (1979). Effect of methylxanthines in sexuality of *Schizophyllum commune*. *Mycologia* 71, 855-861.
- Dürrenberger, F., Wong, K. und Kronstad, J.W.** (1998). Identification of a cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit required for virulence and morphogenesis in *Ustilago maydis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 5684-5689.
- Essig, F.M.** (1922). The morphology, development and economic aspects of *Schizophyllum commune* Fries. *Univ. Calif. Public.* 7, 447-498.
- Enke, C., Zekert, N., Veith, D., Schaaf, C., Konzack, S. und Fischer, R.** (2007). *Aspergillus nidulans* Dis/XMAP215 protein AlpA localizes to spindle pole bodies and microtubule plus ends and contributes to growth directionality. *Eukaryot. Cell* 6, 555-562.
- Feng, Q., Summers, E., Guo, B. und Fink, G.** (1999). Ras signaling is required for serum-induced hyphal differentiation in *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* 181, 6339-6346.
- Fillinger, S., Chaverroche, M.K., Shimizu, K., Keller, N.P. und d'Enfert, C.** (2002). cAMP and ras signalling independently control spore germination in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* 44, 1001-1016.

- Fischer, R. und Timberlake, W.E.** (1995). *Aspergillus nidulans* *aps1* (anucleate primary sterigmata) encodes a coiled-coil protein required for nuclear positioning and completion of asexual development. *J. Cell Biol.* 128, 485-498.
- Fischer, R.** (1999). Nuclear movement in filamentous fungi. *FEMS Microbiol. Rev.* 23, 39-68.
- Fortwendel, J.R., Panepinto, J.C., Seitz, A.E., Askew, D.S. und Rhodes, J.C.** (2004). *Aspergillus fumigatus* *rasA* and *rasB* regulate the timing and morphology of asexual development. *Fungal Genet. Biol.* 41, 129-139.
- Fortwendel, J.R., Zhao, W., Bhabhra, R., Park, S., Perlin, D.S., Askew, D.S. und Rhodes, J.C.** (2005). A fungus-specific Ras homolog contributes to the hyphal growth and virulence of *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot. Cell* 4, 1982-1989.
- Fukui, Y., Kozasa, T., Kaziro, Y., Takeda, T. und Yamamoto** (1986). Role of a ras homolog in the life cycle of *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell* 44, 329-336.
- Gibbs, C.S., Knighton, D.R., Sowadski, J.M., Taylor, S.S. und Zoller, M.J.** (1992). Systematic Mutational Analysis of cAMP-dependent Protein Kinase Identifies Unregulated Catalytic Subunits and Defines Regions Important for the Recognition of the Regulatory Subunit. *J Biol. Chem.* 267, 4806-4814.
- Gola, S. und Kothe, E.** (2003). An expression system for the functional analysis of pheromone genes in the tetrapolar basidiomycete *Schizophyllum commune*. *J. Basic Microbiol.* 43, 104-112.
- Gold, S., Duncan, G., Barrett, K. und Kronstad, J.** (1994). cAMP regulates morphogenesis in the fungal pathogen *Ustilago maydis*. *Genes Dev.* 8, 2805-2816.
- Gold, S.E., Brogdon, S.M., Mayorga, M.E. und Kronstad, J.W.** (1997). The *Ustilago maydis* Regulatory Subunit of a cAMP-Dependent Protein Kinase Is Required for Gail Formation in Maize. *Plant Cell* 9, 1585-1594.
- Gube, M.** (2007). The gleba of *Langermannia gigantea* (Batsch: Pers.) Rostk. (Basidiomycetes) compared to other Lycoperdaceae, and some systematic implications. *Mycologia* 99, 396-405.
- Ha, Y., Memmott, S.D. und Dickman, M.B.** (2003). Functional analysis of Ras in *Colletotrichum trifolii*. *FEMS Microbiol. Lett.* 226, 315-321.
- Harris, S.D., Read, N.D., Roberson, R.W., Shaw, B., Seiler, S., Plamann, M. und Momany, M.** (2005). Polarisome meets Spitzenkörper: Microscopy, genetics, and genomics converge. *Eukaryot. Cell* 4, 225-229.
- Harvey, J.J.** (1964). An unidentified virus which causes the rapid production of tumors in mice. *Nature* 204, 1104-1105.
- Hatanaka, M. und Shimodo, C.** (2001). The cyclic AMP/PKA signal pathway is required for initiation of spore germination in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* 18, 207-217.
- Hicks, J.K., D'Souza, C.A., Cox, G.M. und Heitman, J.** (2004). Cyclic AMP-dependent protein kinase catalytic subunit have divergent roles in virulence factor production in two varieties of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot. Cell* 3, 14-26.
- Ho, J. und Bretscher, A.** (2001). Ras regulates the polarity of the yeast actin cytoskeleton through the stress response pathway. *Mol. Biol. Cell* 12, 1541-1555.
- Hori, K., Kajiwara, S., Saito, T., Miyazawa, H., Katayose, H. und Shishido, K.** (1991). Cloning sequence analysis and transcriptional expression of a *ras* gene of the edible basidiomycete *Lentinula edodes*. *Gene* 105, 91-96.
- Horio, T.** (2007). Role of microtubules in tip growth of fungi, *J. Plant Res.* 120, 53-60.
- Howard, R.J.** (1981). Ultrastructural analysis of hyphal tip cell growth in fungi: Spitzenkörper, cytoskeleton, and endomembranes after freeze-substitution. *J. Cell Sci.* 48, 89-103.

- Juo, Z.S., Chiu, T.K., Leibermann, P.M., Baikarov, I., Berk, A.J. und Dickerson, R.E.** (1996). How proteins recognize the TATA box. *J. Mol. Biol.* 261, 239-254.
- Kahmann, R., Basse, C. und Feldbrügge, M.** (1999). Fungal-plant signalling in the *Ustilago maydis*-maize pathosystem. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 647-650.
- Kana-uchi, A., Yamashiro, C.T., Tanabe, S. und Murayama, T.** (1997). A *ras* homologue of *Neurospora crassa* regulates morphology. *Mol. Gen. Genet.* 254, 427-432.
- Kataoka, T., Powers, S., McGill, C., Fasano, O., Strathern, J., Broach, J. und Wigler, M.** (1984). Genetic analysis of yeast RAS1 and RAS2 Genes. *Cell* 37, 437-445.
- Kinoshita, H., Sen, K., Iwama, H., Samadder, P.P., Kurosawa, S. und Shibai, H.** (2002). Effects of indole and caffeine on cAMP in the *ind1* and *cfn1* mutant strains of *Schizophyllum commune* during sexual development. *FEMS Microbiol. Lett.* 206, 247-251.
- Knabe, N.** (2001). Untersuchung von Komponenten der Signaltransduktion in der Pheromonantwort des Basidiomyceten *Schizophyllum commune*. Diplomarbeit
- Kniep, H.** (1920). Über morphologische und physiologische Geschlechtsdifferenzierung, Untersuchung an Basidiomyceten. *Verh. Phys. Med. Ges. Würzburg* 46, 1-18.
- Kniep, H.** (1922). Über Geschlechtsbestimmung und Reduktionsteilung. *Verh. Phys. Med. Ges. Würzburg* 47, 1-28.
- Knighton, D.R., Zheng, J., Ten Eyck, L.F., Ashford, V.A., Xuong, N.H., Taylor, S.S. und Sowadski, J.M.** (1991). Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science* 253, 407-420.
- Koltin, Y., Raper, J.R. und Simchen, G.** (1967). The genetic structure of the incompatibility factors in *Schizophyllum commune*: the *B* factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 57, 55-62.
- Koltin, Y. und Raper, J.R.** (1968). Dikaryosis: genetic determination in *Schizophyllum*. *Science* 160, 85-86.
- Koltin, Y. und Flexer, A.S.** (1969). Alternation of nuclear distribution in *B*-mutant strains of *Schizophyllum commune*. *J. Cell. Sci.* 4, 739-749.
- Koltin, Y., Stamborg, J. und Lemke, P.A.** (1972). Genetic structure and evolution of the incompatibility factors in higher fungi. *Bacteriol. Rev.* 36, 156-171.
- Konzack, S., Rischitor, P.E., Enke, C. und Fischer, R.** (2005). The role of the kinesin motor KipA in microtubule organization and polarized growth of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Biol. Cell* 16, 497-506.
- Kore-eda, S., Murayama, T. und Uno, I.** (1991). Isolation and characterisation of the adenylate cyclase structural gene of *Neurospora crassa*. *Jpn. J. Genet.* 66, 317-334.
- Kothe, E.** (1996). Tetrapolar fungal mating types: Sexes by the thousands. *FEMS Microbiol. Rev.* 18, 65-87
- Kozak, M.** (1984). Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs. *Nucl. Acids Res.* 12, 857-872.
- Kraakman, L., Lemaire, K., Ma, P., Teunissen, A.W.R.H., Donaton, M.C.V., Van Dijck, P., Winderickx, J., de Winde, J.H. und Thevelein, J.M.** (1999). A *Saccharomyces cerevisiae* G-protein coupled receptor, Gpr1, is specifically required for glucose activation of the cAMP pathway during the transition to growth on glucose. *Mol. Microbiol.* 32, 1002-1012.
- Lai, C., Boguski, M., Broek, D. und Powers, S.** (1993). Influence of guanine nucleotides on complex formation between Ras and CDC25 proteins. *Mol. Cell. Biol.* 13, 1345-1352.

- Leberer, E., Harcus, D., Dignard, D., Johnson, L., Ushinsky, S., Thomas, D.Y. und Schröppel, K.** (2001). Ras links cellular morphogenesis to virulence by regulation of the MAP kinase and cAMP signalling pathways in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* 42, 673-687.
- Lee, N. und Kronstad, J.W.** (2002). ras2 controls morphogenesis, pheromone response, and pathogenicity in the fungal pathogen *Ustilago maydis*. *Eukaryot. Cell* 1, 954-966.
- Lengeler, K. und Kothe, E.** (1994). Molecular characterization of *ura1*, a mutant allele for orotidine-5'-monophosphate decarboxylase in *Schizophyllum commune*. *FEMS Microbiol.Lett.* 119, 243-248.
- Lengeler, K.B., Davidson, R.C., D'Souza, C., Harashima, T., Shen, W.-C., Wang, P., Pan, X., Waugh, M. und Heitman, J.** (2000). Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64: 746-785.
- Li, Y., Chen, C. und Chang, E.C.** (2000). Fission yeast Ras1 effector Scd1 interacts with the spindle and affects its proper formation. *Genetics* 156, 995-1004.
- Liebmann, B., Gattung, S., Jahn, B. und Brakhage, A.A.** (2003) cAMP signaling in *Aspergillus fumigatus* is involved in the regulation of the virulence gene *pksP* and in defense against killing by macrophages. *Mol. Gen. Genom.* 269, 420-435.
- Liebmann, B., Müller, M., Braun, A. und Brakhage, A.A.** (2004) The cyclic AMP-dependent protein kinase A network regulates development and virulence in *Aspergillus fumigatus*. *Infect. Immun.* 72, 5193-5203.
- Liu, Y., Whittier, R.F.** (1995). Thermal asymmetric interlaced PCR: Automatable amplification and sequencing of insert end fragment from P1 and YAC clones for chromosome walking. *Genomics* 25, 674-681.
- Lottspeich, F., Zorbas, H.** (1998). Bioanalytik, Spektrum Akademischer Verlag, HD.
- Lowy, D.R.** (1993). Function and regulation of ras. *Annu. Rev. Biochem.* 62, 851-891.
- Maeda, T., Watanabe, Y., Kunitomo, H. und Yamamoto, M.** (1994). Cloning of the *pkA1* Gene Encoding the Catalytic Subunit of the cAMP-dependent Protein Kinase in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol. Chem.* 269, 9632-9637.
- Mahlert, M., Leveleki, L., Hlubek, A., Sandrock, B. und Bölker, M.** (2006). Rac1 and Cdc42 regulate hyphal growth and cytokinesis in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. *Mol. Microbiol.* 59, 567-578.
- Maidan, M.M., De Rop, L., Serneels, J., Exler, S., Rupp, S. Tournu, H., Thevelein, J.M. und Van Dijck, P.** (2005). The G protein-coupled receptor Gpr1 and the Gα protein Gpa2 act through the cAMP-protein kinase A pathway to induce morphogenesis in *Candida albicans*. *Mol. Biol. Cell* 16, 1971-1986.
- Marcus, S., Polverino, A., Chang, E., Robbins, D., Cobb, M.H. und Wigler, M.H.** (1995). Shk1, a homolog of the *Saccharomyces cerevisiae* Ste20 and mammalian p65^{PAK} protein kinases, is a component of a Ras/Cdc42 signaling module in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 6180-6184.
- Martin, R., Walther, A. und Wendland, J.** (2005). Ras1-induced hyphal development in *Candida albicans* requires the formin Bni1. *Eukaryot. Cell* 4, 1712-1724.
- Memmott, S.D., Ha, Y. und Dickman, M.B.** (2002). Proline Reverses the Abnormal Phenotypes of *Colletotrichum trifolii* Associated with Expression of Endogenous Constitutively Active Ras. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1647-1651.
- Moore, D.** (1998). Fungal Morphogenesis. Cambridge University Press, Cambridge.
- Moore, D. und Frazer, L.N.** (2002). Essential Fungal Genetics. Springer Verlag, New York.

- Mösch, H., Roberts, R.L. und Fink, G.R.** (1996). Ras2 signals via the cdc42/Ste20/mitogen-activated protein kinase module to induce filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 5352-5356.
- Mösch, H., Kübler, E., Krappmann, S., Fink, G.R. und Braus, G.H.** (1999). Crosstalk between the Ras2p-controlled mitogen-activated protein kinase and cAMP pathways during invasive growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 10, 1325-1335.
- Mulder, G.H. Und Wessels, J.G.H.** (1986). Molecular cloning of mRNAs differentially expressed in monokaryons and dikaryons of *Schizophyllum commune* in relation to fruiting. *Exp. Mycol.* 10, 214-227.
- Müller, P., Katzenberge, D., Loubadou, G. und Kahmann, R.** (2003). Guanyl nucleotide exchange factor Ssl2 and Ras2 regulate filamentous growth in *Ustilago maydis*. *Eukaryot. Cell* 2, 609-617.
- Muñoz-Rivas, A.M., Specht, C.A., Ullrich, R.C. Und Novotny, C.P.** (1986). Isolation of the DNA sequence coding indole-3-glycerol phosphate synthetase and phosphoribosyllanthranilate isomerase of *Schizophyllum commune*. *Curr. Genet.* 10, 909-913.
- Ni, M., Rierison, S., Seo, J. und Yu, J.** (2005). The *pkaB* Gene Encoding the Secondary Protein Kinase A Catalytic Subunit Has a Synthetic Lethal Interaction with *pkaA* and Plays Overlapping and Opposite Roles in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot. Cell* 4, 1465-1476.
- Nichols, C.B., Perfect, Z.H. und Alspaugh, J.A.** (2007). A Ras1-Cdc24 signal transduction pathway mediates thermotolerance in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Mol. Microbiol.* 63, 1118-1130.
- Niederpruem, D.J.** (1963). Role of carbon dioxide in the control of fruiting of *Schizophyllum commune*. *J. Bacteriol.* 85, 1300-1308.
- Niederpruem, D.J., Jersild, R.A. und Lane, P.L.** (1971). Direct microscopic studies of clamp connection formation in growing hyphae of *Schizophyllum commune*: I. The dikaryon. *Arch. Microbiol.* 78, 268-280.
- Niederpruem, D.J., Jersild, R.A. und Lane, P.L.** (1971). Direct microscopic studies of clamp connection formation in growing hyphae of *Schizophyllum commune*: II. The A-mutant homokaryon and pseudo-clamp connections. *Arch. Microbiol.* 80, 19-31.
- Niederpruem, D.J.** (1980). Direct studies of dikaryotization in *Schizophyllum commune*. II. Behaviour and fate of multikaryotic hyphae. *Arch. Microbiol.* 128, 172-178.
- Nikawa, J., Cameron, S., Toda, T., Ferguson, K.M. und Wigler, M.** (1987). Rigorous feedback control of cAMP levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 1, 931-937.
- Oliver, B.G., Panepinto, J.C., Fortwendel, J.R., Smith, D.L., Askew, D.S. und Rhodes, J.C.** (2001). Cloning and expression of *pkaC* and *pkaR*, the genes encoding the cAMP-dependent protein kinase of *Aspergillus fumigatus*. *Mycopathologia* 154: 85-91.
- Orth, A.B., Rzhetskaya, M., Pell, E.J. und Tien, M.** (1995). A serine (threonine) protein kinase confers fungicide resistance in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Appl. Environm. Microbiol.* 61, 2341-2345.
- Oshero, N. und May, G.** (2000). Conidial germination in *Aspergillus nidulans* requires RAS signaling and protein synthesis. *Genetics* 155, 647-656.
- Ottile, S., Miller, P.J., Johnson, D.I., Creasy, C.L., Sells, M.A., Bagroia, S., Forsburg, S.L. und Chernoff, J.** (1995). Fission yeast *pak1*⁺ encodes a protein kinase that interacts with Cdc42p and is involved in the control of cell polarity and mating. *EMBO J.* 14, 5908-5919.

- Pan, X., Heitman, J.** (1999). Cyclic AMP-dependent protein kinase regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 19, 4874-4887.
- Papadaki, P., Pizon, V., Onken, B. und Chang, E.C.** (2002). Two Ras pathways in fission yeast are differentially regulated by two Ras guanine nucleotide exchange factors. *Mol. Cell. Biol.* 22, 4598-4606.
- Park, J., Grant, C.M. und Dawes, I.W.** (2005). The high-affinity phosphodiesterase of *Saccharomyces cerevisiae* is the major determinant of cAMP levels in stationary phase: involvement of different branches of the Ras-cyclic AMP pathway in stress response. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 327, 311-319.
- Qyang, Y., Yang, P., Du, H., Lai, H., Kim, H. und Marcus, S.** (2002). The p21-activated kinase, Shk1, is required for proper regulation of microtubule dynamics in the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Microbiol.* 44, 325-334.
- Radu, M., Steinlauf, R. und Koltin, Y.** (1974). Meiosis in *Schizophyllum commune*: Chromosomal behaviour and the synaptenomal complex. *Arch. Microbiol.* 98, 301-310.
- Raju., N.B.** (1982). Easy methods for fluorescent staining of *Neurospora* nuclei. *Neurospora Newsletter* 29, 24-25.
- Raper, J.R., Baxter, M.G. und Middleton, R.B.** (1958). The genetic structure of the incompatibility factors in *Schizophyllum commune*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 44: 889-900
- Raper, J.R., Baxter, M.G. und Ellingboe, A.H.** (1960). The genetic structure of the incompatibility factors of *Schizophyllum commune*: the A factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 46: 833-842.
- Raper, J.R.** (1966). Genetic of Sexuality in Higher Fungi. Ronald Press, New York.
- Raudaskoski, M.** (1972). Occurrence of microtubules in the hyphae of *Schizophyllum commune* during intercellular nuclear migration. *Arch. Microbiol.* 86, 91-100.
- Raudaskoski, M. und Viitanen, H.** (1982). Effects of aeration and light on fruit body induction in *Schizophyllum commune*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 78, 89-96.
- Raudaskoski, M.** (1988). The relationship between B-mating-type genes and nuclear migration in *Schizophyllum commune*. *Fungal Genet. Biol.* 24, 207-227.
- Raudaskoski, M., Rupeš, und Timonen, S.** (1991). Immunofluorescence microscopy of the cytoskeleton in filamentous fungi after quick-freezing and low temperature fixation. *Exp. Mycol.* 15, 167-173.
- Riquelme, M., Reynaga-Peña, C.G., Gierz, G. und Bartnicki-Garcia, S.** (1998). What determines growth direction in fungal hyphae? *Fungal Genet. Biol.* 24, 101-109.
- Robertson, L.S. und Fink, G.R.** (1998). The three yeast A kinases have specific signaling functions in pseudohyphal growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 13783-13787.
- Robertson, L.S., Causton, H.C., Young, R.A. und Fink, G.R.** (2000). The yeast a kinases differentially regulate iron uptake and respiratory function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 5984-5988.
- Rocha, C.R.C., Schröppel, K., Harcus, D., Marcil, A., Dignard, D., Taylor, B.N., Thomas, D.Y., Whiteway, M. und Leberer, E.** (2001). Signaling through adenylyl cyclase is essential for hyphal growth and virulence in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Mol. Biol. Cell* 12, 3631-3643.
- Rozman, D. und Komel, R.** (1994). Isolation of genomic DNA from filamentous fungi with high glucan level. *BioTechniques* 16, 382.
- Rudoni, S., Colombo, S., Coccetti, P. und Martegani, E.** (2001). Role of guanine nucleotides in the regulation of the Ras/cAMP pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 1538, 181-189.

- Ruiters, M.H.J., Sietsma, J.H. und Wessels, J.G.H.** (1988). Expression of dikaryon-specific mRNAs of *Schizophyllum commune* in relation to incompatibility genes, light and fruiting. *Exp. Mycol.* 12, 60-69.
- Rupeš, I., Mao, W.-Z., Åström, H und Raudaskoski, M.** (1995). Effects of nocodazole and brefeldin A on microtubule cytoskeleton and membrane organization in the basidiomycete *Schizophyllum commune*. *Protoplasma* 185, 212-221.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. und Erlich H.A.** (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
- Sambrook J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.** (1989) Molecular cloning - A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Sampson, K. und Heath, I.B.** (2005). The dynamic behaviour of microtubules and their contributions to hyphal tip growth in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology* 151, 1543-1555.
- Schubert, D., Lengeler, K.B. und Erika Kothe** (2000). Identification of mating-type dependent genes by non-radioactive, arbitrarily primed PCR in *Schizophyllum commune*. *J. Basic Microbiol.* 40, 65-70.
- Schubert, D., Raudaskoski, M., Knabe, N. und Kothe, E.** (2006). Ras GTPase-activating protein Gap1 of the homobasidiomycete *Schizophyllum commune* regulates hyphal growth orientation and sexual development. *Eukaryot. Cell* 5, 683-695.
- Schuren, F.H.J.** (1992). Regulation of gene expression during fruit-body development in *Schizophyllum commune*. Dissertation, Gronigen, Niederlande.
- Schuurs, T.A., Schaeffer, A.M. und Wessels, J.G.H.** (1997). Homology-dependent silencing of the *sc3* gene in *Schizophyllum commune*. *Genetics* 147, 589-596.
- Schwalb M.N. und Miles, P.G.** (1967). Morphogenesis of *Schizophyllum commune* L. Morphological variation and mating behavior of the thin mutation. *Am J. Bot.* 54, 440-446.
- Schwalb, M.N.** (1974). Effect of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate on the morphogenesis of fruit bodies of *Schizophyllum commune*. *Arch. Mikrobiol.* 96, 17-20.
- Schwalb, M.N.** (1978). Regulation of fruiting. In: „Genetics and Morphogenesis in the Basidiomycetes“ (Schwalb, M.N and Miles, P.G., Hrsg.) Academic Press, New York.
- Shimizu, K. und Keller, N.P.** (2001). Genetic involvement of a cAMP-dependent protein kinase in a G protein signaling pathway regulating morphological and chemical transitions in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 157, 591-600.
- Sietsma, J.H., Rast, D. und Wessels, J.G.H.** (1977). The effect of carbon dioxide on fruiting and on degradation of a cell-wall glucan in *Schizophyllum commune*. *J. Gen. Microbiol.* 102, 385-389.
- Som, T. und Kolaparthi, V.S.R.** (1994). Developmental decisions in *Aspergillus nidulans* are modulated by Ras activity. *Mol. Cell Biol.* 14, 5333-5348.
- Sonneborn, A., Bockmühl, D.P., Gerads, M., Kurpanek, K., Sanglard, D. und Ernst, J.F.** (2000). Protein kinase A encoded by TPK2 regulates dimorphism of *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* 35, 386-396.
- Southern, E.M.** (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503-517.
- Specht, C.A., Munoz-Rivaz, A., Novotny, C.P. Und Ullrich, R.C.** (1988). Transformation of *Schizophyllum commune*: An analysis of parameters for improving transformation frequencies. *Exp. Mycol.* 12, 357-366.

- Specht, C.A., Stankis, M.M., Giasson, L., Novotny, C.P. und Ullrich, R.C.** (1992). Functional analysis of the homeodomain-related proteins of the *Aα*-locus of *Schizophyllum commune*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 7174-7178.
- Specht, C.A.** (1995). Isolation of the *Bα* and *Bβ* mating-type loci of *Schizophyllum commune*. *Curr. Genet.* 28: 374-379.
- Sprang, S.R.** (1997). G protein mechanisms: Insights from structural analysis. *Annu. Rev. Biochem.* 66, 639-678.
- Stamberg, J. und Koltin, Y.** (1974). Recombinational analysis at an incompatibility locus of *Schizophyllum*. *Mol. Gen. Genet.* 135, 45-50.
- Steinberg, G.** (2006). Preparing the way: fungal motors in microtubule organization. *Trends Microbiol.* 15, 14-21.
- a) **Steinberg, G.** (2007). Tracks for traffic: microtubules in the plant pathogen *Ustilago maydis*. *New Phytol.* 174, 721-733.
- b) **Steinberg, G.** (2007). Hyphal growth: a tale of motors, lipids, and the Spitzenkörper. *Eukaryot. Cell* 6, 351-360.
- Steinberg, G. und Perez-Martin, J.** (2007). *Ustilago maydis*, a new fungal model system for cell biology. *Trends Cell Biol.* 18, 61-67.
- Štaudohar, M., Benčina, M., van de Vondervoort, P.J., Panneman, H., Legiša, M., Visser, J. und Ruijter, J.G.** (2002) Cyclic AMP-dependent protein kinase is involved in morphogenesis of *Aspergillus niger*. *Microbiology* 148, 2635-2645.
- Sundaram, S., Brand, J.H., Hymes, M.J., Hiremath, S. und Podila, G.K.** (2003). Isolation and analysis of a symbiosis-regulated and Ras-interacting vesicular assembly protein gene from the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*. *New Phytol.* 161, 529-538.
- Takagi, Y., Katayose, Y. und Shishido, K.** (1988). Intracellular levels of cyclic AMP and adenylate cyclase activity during mycelial development in fruiting body formation in *L. edodes*. *FEMS Microbiol. Lett.* 55, 275-278.
- Takeshita, N., Higashitsuji, Y., Konzack, S. und Fischer, R.** (2008). Apical sterol-rich membranes are essential for localizing cell end markers that determine growth directionality in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol. Biol. Cell* 19, 339-351.
- Tanaka, K., Matsumoto, K. und Toh-E, A.** (1989). IRA1, an inhibitory regulator of the RAS-cyclic AMP Pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 9, 757-768.
- Tanaka, K., Nakafuku, M., Tamanoi, F., Kaziro, Y., Matsumoto, K. und Toh-E, A.** (1990). IRA2, a second gene of *Saccharomyces cerevisiae* that encodes a protein with a domain homologous to mammalian *ras* GTPase-activating protein. *Mol. Cell. Biol.* 10, 4303-4313.
- Tanaka, K., Lin, B.K., Wood, D.R. und Tamanoi, F.** (1991). IRA2, an upstream negative regulator of RAS in yeast, is a RAS GTPase-activating protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 468-472.
- Tanaka, Y., Kaneko, S., Katsukawa, S., Yamazaki, T., Ohta, A., Miyazaki, Y. und Shishido, K.** (2005). Specific distribution in homobasidiomycete hymenophores of the transcripts of Ras protein and G-protein α -subunit genes. *FEMS Microbiol. Lett.* 242, 169-175.
- Taylor, S.S., Buechler, J.A. und Yonemoto, W.** (1990). cAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 59, 971-1005.
- Taylor, S.S., Knighton, D.R., Zheng, J., Sowadski, J.M., Gibbs, C.S. und Zoller, M.J.** (1993). A template for the protein kinase family. *Trends Biochem. Sci.* 18, 84-89.

- Thevelein, J.M. und de Winde, J.H. (1999).** Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 33, 904-918.
- Toda, T., Uno, I., Ishikawa, T., Powers, S., Kataoka, T., Broek, D., Cameron, S., Broach, J., Matsumoto, K. und Wigler, M. (1985).** In yeast, RAS proteins are controlling elements of adenylate cyclase. *Cell* 40, 27-36.
- Toda, T., Cameron, S., Sass, P., Zoller, M. und Wigler, M. (1987).** Three different genes in *S. cerevisiae* encode the catalytic subunits of the cAMP-dependent protein kinase. *Cell* 50, 277-287.
- Truesdell, G.M., Jones, C., Holt, T., Henderson, G. und Dickman, M.B. (1999).** A Ras protein from a phytopathogenic fungus causes defects in hyphal growth polarity, and induces tumors in mice. *Mol. Gen. Genet.* 262, 46-54.
- Uchida, M., Mouriño-Pérez, R.R., Freitag, M. Bartnicki-Garcia, S. und Roberson, R.W. (2008).** Microtubule dynamics and the role of molecular motors in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet. Biol.* in press.
- Uno, I., Yamaguchi, M. und Ishikawa, T. (1974).** The effect of light on fruiting body formation and adenosine 3':5'-cyclic monophosphate metabolism in *Coprinus macrorrhizus*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71, 497-483.
- Vaillancourt, L.J., Raudaskoski M., Specht, C.A. und Raper, C.A. (1997).** Multiple genes encoding pheromones and a pheromone receptor define the Bß1 mating-type specificity in *Schizophyllum commune*. *Genetics* 146: 541-551
- van der Valk, P. und Marchant, R. (1978).** Hyphal ultrastructure in fruit-body primordia of the basidiomycetes *Schizophyllum commune* and *Coprinus cinereus*. *Protoplasma* 95, 57-72.
- Vargas, M.M., Aronson, J.M. und Roberson, R.W. (1993).** The cytoplasmic organization of hyphal tip cells in the fungus *Allomyces macrogynus*. *Protoplasma* 176, 43-52.
- Volz, P.A. und Niederpruem, D.J. (1969).** Dikaryotic fruiting in *Schizophyllum commune* Fr.: Morphology of the developing basidiocarp. *Arch. Microbiol.* 68, 246-258.
- Wahle, E. (1992).** The end of the message: 3'-end processing leading to polyadenylated messenger RNA. *Bioessays* 14, 113-118.
- Wang, P. und Heitman, J. (1999).** Signal transduction cascades regulating mating, filamentation, and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 358-362.
- Waugh, M.S., Nichols, C.B., DeCesare, G.M.C., Heitman, J. und Alspaugh, J.A. (2002).** Ras1 and Ras2 contribute shared and unique roles in physiology and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology* 148, 191-201.
- Waugh, M.S., Vallim, M.A., Heitman, J. und Alspaugh, J.A. (2003).** Ras1 controls pheromone expression during mating in *Cryptococcus neoformans*. *Fungal Genet. Biol.* 38, 110-121.
- Weber, M., Salo, V., Uuskallio, M. und Raudaskoski, M. (2005).** Ectopic expression of a constitutively active Cdc42 small GTPase alters the morphology of haploid and dikaryotic hyphae in the filamentous homobasidiomycete *Schizophyllum commune*. *Fungal Genet. Biol.* 42, 624-637.
- Wendland, J., Vaillancourt, L.J., Hegner, J., Lengeler, K.B., Laddison, K.J., Specht, C.A., Raper, C.A. und Kothe, E. (1995).** The mating-type locus *Bα1* of *Schizophyllum commune* contains a pheromone receptor gene and putative pheromone genes. *EMBO J* 14: 5271-5278.
- Wendland, J., Lengeler, K., Kothe, E. (1996).** An instant preparation method for nucleic acids of filamentous fungi. *Fungal Genet. Newslet.* 43, 54-55.

- Wendland, J. und Philippsen, P. (2002).** Determination of cell polarity in germinated spores and hyphal tips of the filamentous ascomycete *Ashbya gossipii* requires a rhoGAP homolog. *J Cell Sci.* 113, 1611-1621.
- Wessels, J.G.H., de Vries, O.M.H., Asgeirsdottir und Schuren, F.H.J. (1991).** Hydrophobin Genes Involved in Formation of Aerial Hyphae and Fruit Bodies in *Schizophyllum*. *Plant Cell* 3, 793-799.
- Westfall, P.J. und Momany, M. (2002).** *Aspergillus nidulans* septin AspB plays pre- and postmitotic roles in septum, branch and conidiophore development. *Mol. Biol. Cell.* 13, 110-118.
- Wittenberg, C. und Reed, S.I. (1996).** Plugging it in: signaling circuits and the yeast cell cycle. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8, 223-230.
- Wong, M.L. und Medrano, J.F. (2005).** Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques* 39, 75-85.
- Yamagishi, K., Kimura, T., Suzuki, M. und Shinmoto, H. (2002).** Suppression of fruit-body formation by constitutively active G-protein α -subunits *ScGP-A* and *ScGP-C* in the basidiomycete *Schizophyllum commune*. *Microbiology* 148, 2797-2809.
- Yamagishi, K., Kimura, T., Suzuki, M., Shinmoto, H. und Yamaki, K. (2004).** Elevation of intracellular cAMP levels by dominant active heterotrimeric G protein alpha subunits *ScGP-A* and *ScGP-C* in homobasidiomycete *Schizophyllum commune*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68, 1017-1026.
- Yamagishi, K., Kimura, T., Suzuki, M., Yamaki, K. und Oita, S. (2005).** Identification and overexpression of genes encoding cAMP-dependent protein kinase catalytic subunits in homobasidiomycete *Schizophyllum commune*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69, 2333-2342.
- Yli-Mattila, T., Ruiters, M.H.J., Wessels, J.G.H. und Raudaskoski, M. (1989).** Effect of inbreeding and light on monokaryotic and dikaryotic fruiting in the homobasidiomycete *Schizophyllum commune*. *Mycol. Res.* 93, 535-542.
- Young, D., Riggs, M., Field, J., Vojtek, A., Broek, D. und Wigler, M. (1989).** The adenylyl cyclase gene from *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc. Natl. Sci. USA* 86, 7989-7993.
- Zhao, W., Paneinto, J.C., Fortwendel, J.R., Fox, L., Oliver, B.G., Askew, D.S. und Rhodes, J.C. (2006).** Deletion of the regulatory subunit of protein kinase A in *Aspergillus fumigatus* alters morphology, sensitivity to oxidative damage and virulence. *Infect. Immun.* 74, 4865-4874.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

Jena, den 27. März 2008

Nicole Knabe

Danksagung

Hiermit bedanke ich mich bei Frau Prof. Dr. Erika Kothe für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und ihre stetige Diskussionsbereitschaft und Unterstützung, die zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonders bedanke ich mich bei Florian und Matthias für die Mikrotomschnitte der Fruchtkörper und bei Elke für die Durchführung der Fluoreszenzmikroskopie.

Für Anregungen und Diskussionen, sowie für die Hilfe bei Schwierigkeiten in der Laborarbeit bedanke ich mich bei Petra, Ines, Felicia, Daniela und allen anderen Mitarbeitern der Abteilung Mikrobiellen Phytopathologie, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben. Bedanken möchte ich mich besonders bei Katrin und Susann, die mich in der letzten Phase des Schreibens tatkräftig unterstützt haben.

Ein großer Dank geht an meine Eltern, auf deren Unterstützung ich während Studium und Promotion immer zählen konnte.

Lebenslauf:

21.09.1975	geboren in Apolda
1982 – 1991	Besuch der POS „Theo-Neubauer-Schule I“ / „BergschuleI“ in Apolda
1991 – 1992	Besuch der Realschule „Geschwister-Scholl“ in Apolda
1992 – 1995	Besuch des Staatlichen berufsbildenden Schulzentrums in Jena-Göschwitz, Abschluss Abitur
1995 – 2001	Biologie-Studium an der Friedrich-Schiller-Universität in Jena, Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie, Lehrstuhl Mikrobielle Phytopathologie, Thema: „Untersuchungen zu Komponenten der Signaltransduktion im Basidiomyceten <i>Schizophyllum commune</i> “
10/2001	Abschluss als Diplombiologin
seit 12/2001	Promotionsstelle an der Friedrich-Schiller-Universität in Jena am Institut für Mikrobiologie, Lehrstuhl Mikrobielle Phytopathologie
04/2002 – 03/2005	Stipendium im Rahmen des Graduiertenkollegs 768 „Biomolekulare Schalter“ an der Friedrich-Schiller-Universität Jena

Präsentationen auf Tagungen:

09/2003	VAAM-Symposium „Molekularbiologie der Pilze“ in Göttingen, Poster
09/2003	„Signaling Complexes“ in Jena, Poster
03/2005	„Fungal Genetics Conference“ in Asilomar (USA), Poster
09/2005	VAAM-Symposium „Molekularbiologie der Pilze“ in Bochum, Poster
03/2006	VAAM-Jahrestagung in Jena, Poster
10/2006	„Biology of Yeast and Filamentous Fungi“ in Frankfurt, Poster
03/2007	„Fungal Genetics Conference“ in Asilomar (USA), Poster
09/2007	VAAM-Symposium „Molekularbiologie der Pilze“ in Hamburg, Vortrag: „Effect of Ras signaling on fruit body formation in the fungus <i>Schizophyllum commune</i> “

Publikation:

Schubert, D., Raudaskoski, M., Knabe, N. und Kothe, E. (2006). Ras GTPase-activating protein Gap1 of the homobasidiomycete *Schizophyllum commune* regulates hyphal growth orientation and sexual development. Eukaryot. Cell 5, 683-695.